

Departement Pferde der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. med. vet. Dr.h.c. Jörg A. Auer, MS, Dipl. ACVS/ECVS

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

In vivo Evaluierung eines Nanocomposites auf seine
osteoinduktiven Eigenschaften im heterotopen
Implantationsmodell

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse-Fakultät
Universität Zürich

vorgelegt von

Hannah Kristine Junge
Tierärztin
aus Berlin (Deutschland)

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin
Prof. Dr. Wendelin Stark, Korreferent

Zürich 2010

Meinen Eltern

in

Verbundenheit und Dankbarkeit

Zusammenfassung	1
Summary.....	2
Einleitung.....	3
1.1 Problemstellung	3
1.2 Zielsetzung der Arbeit	3
1.3 Versuchsanordnung	4
<hr/>	
2 Literaturübersicht.....	5
2.1 Osteoinduktivität und das Skin-Pouch-Modell als anerkannte Nachweismethode/ die heterotope Implantation.....	5
2.2 Knochenzusammensetzung und Heilung.....	8
2.3 Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien in der Knochenchirurgie 11	
2.3.1 Knochentransplantate.....	12
2.3.2 Knochenersatzmaterialien.....	13
2.3.3 Osteoinduktive Knochenersatzmaterialien	16
<hr/>	
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Aufbau der Studie	20
3.2 Eingesetzte Implantate	21
3.2.1 NanoBone®	21
3.2.2 Nexus IC®	21
3.2.3 betaGran®	21
3.3 Vorbereitung	21
3.4 Operation	21
3.4.1 Operationsvorbereitung	21
3.4.2 Anästhesie	22
3.5 Chirurgischer Eingriff.....	22
3.6 Postoperatives Management	23
3.7 Probengewinnung und –aufbereitung	23
3.7.1 Gewinnung und Aufbereitung der Proben	23
3.7.2 Aufbereitung der Leerproben.....	25
3.8 Untersuchungsmethoden und Probenauswertung	25

Inhaltsverzeichnis

3.8.1	Untersuchungsmethoden	25
3.8.2	Probenauswertung	26
3.8.3	Statistik	28

4	Resultate	29
4.1	Operation	29
4.2	Postoperative Phase	29
4.3	Makroskopische Auswertung	29
4.3.1	Subkutantaschen	29
4.3.2	Muskeltaschen	30
4.4	Mikroradiographien	30
4.5	Dickschnitte	30
4.6	Histologische Auswertung	31
4.6.1	Subcutantaschen	31
4.6.2	Muskeltaschen	33
4.6.3	Statistischer Vergleich der Implantate	34
4.7	Fluoreszenzschnitte	35
4.7.1	Subcutantaschen	35
4.7.2	Muskeltaschen	36
4.7.3	Leerproben	36

5	Diskussion	37
5.1	Schlussfolgerung und Perspektiven	44

6	Literaturverzeichnis	47
---	----------------------------	----

	Abkürzungsverzeichnis	63
--	-----------------------------	----

	Anhang	64
	Abbildungen	64
	Tabellen	68

	Danksagung	72
--	------------------	----

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie sollte die osteoinduktive Eigenschaft eines synthetischen Nanocomposites evaluiert und mit einer Positiv- sowie Negativkontrolle verglichen werden. Hierzu wurden Ratten Implantate in Subkutan- und Muskeltaschen eingesetzt. 3 Ratten erhielten das Composite NanoBone[®], das Allograft Nexus IC[®] oder den Knochenwerkstoff betaGran[®]. 3 Ratten bekamen 2 Mal jedes Produkt implantiert. Es wurde Calcein grün appliziert. Die Ratten wurden euthanasiert und die Proben makroskopisch sowie histologisch ausgewertet.

Die Operationen und die postoperative Phase verliefen komplikationslos. Das NanoBone[®] zeigte eine bindegewebig-zelluläre Kolonisation und die Ablagerung einer matrixartigen Schicht, die kalzifizierte. In allen Fällen war eine Bindegewebskapsel um das Material darstellbar. Zellulär dominierten Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen, gefolgt von Lymphozyten und Plasmazellen. Im Vergleich zur demineralisierten Knochenmatrix lagen die Apposition und Kalzifikation signifikant niedriger. Gegenüber dem β -Trikalziumphosphat waren Materialbesiedlung, Infiltration, Apposition und Kalzifikation nicht vergleichbar, da dies bei der Schnittherstellung herausbröckelte. Osteoid und enchondrale Ossifikation konnten nur bei der DBM angesprochen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nicht von Osteoinduktion im klassischen Sinn gesprochen werden kann aber die Matrixapposition und deren Kalzifikation lassen einen die Induktion positiv beeinflussenden Prozess vermuten.

Summary

In the present study the osteoinductive property of a synthetic bone graft material was evaluated and compared to positive and negative controls. For this purpose rats received implants inserted in muscle or subcutaneous pouches. 3 of them obtained the nanocomposite NanoBone[®], the allograft Nexus IC[®] or the bone substitute betaGran[®] and the other 3 animals received two implants of each material respectively. Calcein green was applied. The rats were euthanasized and the specimens were evaluated macroscopically and histologically.

There were no complications in surgery and in the postoperative phase. The nanocomposite showed a material colonisation characterized by a fibro- cellular infiltration and an apposition of a matrix-like layer could be visualized, which started to calcify. In all cases a capsule of connective tissue surrounding the material could be demonstrated. The dominating cells were macrophages and foreign body cells, followed by lymphocytes and plasma cells. Compared to the demineralised bone matrix the apposition and calcification was significantly lower. In terms of material colonisation, infiltration, apposition and calcification a comparison to β -tricalciumphosphate was not possible because of its disintegration during the slicing procedure. Osteoid and enchondrale ossification could be seen in DBM.

In conclusion the tested bone substitute showed no osteoinduction in a classical meaning, but there is an evidence for a positive influence for the induction process.

Einleitung

1.1 Problemstellung

Da seit über einem Jahrhundert in der traumatischen sowie orthopädischen Knochenchirurgie versucht wird, mit Knochentransplantaten und verschiedensten Knochenersatzstoffen eine rasch voranschreitende und komplikationslose Frakturheilung zu erreichen, wünscht man sich ein Knochenimplantat, dessen Material in seinen Eigenschaften dem immer noch als Goldstandard geltenden autologen Knochentransplantat gleicht¹⁻³. Das bedeutet das Ziel würde in einem Implantat liegen, das neben osteointegrativen und osteokonduktiven Eigenschaften auch die Fähigkeit zur Osteoinduktion besitzt. Die Gründe für die Suche nach einem Ersatzmaterial liegen in der zusätzlichen Operation, der verlängerten Dauer, der limitierten Ausbeute an geernteten Knochen und der relativ hohen Komplikationsrate bei der Nutzung von autologen Knochentransplantaten.^{1,4} Das seit längerem in der Knochenchirurgie zur Förderung der Frakturheilung, der Knochendefektrekonstruktion und -auffüllung genutzte Hydroxylapatit gehört zur Gruppe der Kalziumphosphat-Knochenersatzmittel. Aufgrund seiner Eigenschaften hat es einen gewissen Stellenwert erlangt, da es biokompatibel, osteokonduktiv, osteoaffin, von geringer Biodegradierbarkeit und guter Biomechanik ist^{5,6}, jedoch nicht osteoinduktiv. Die bisher eingesetzten Hydroxylapatit-Knochenimplantate erfüllen zwar die Funktion eines Leitschienensystems für das Einwachsen neuen Knochens, aber das Ziel liegt in einem das Knochenwachstum zusätzlich induzierenden Implantattyp. Daher wurde ein neues Knochenregenerationsmaterial (NanoBone[®], Artoss GmbH, Rostock, Deutschland) entwickelt, das eine Komposition aus Hydroxylapatitkristallen eingebettet in eine Siliziumdioxid-Struktur (SiO₂) ist. Die daraus resultierende hohe Porosität und die Siliziumdioxid-Moleküle sollen im Verbund mit dem Patientenblut neben der Osteokonduktivität auch die Osteoinduktivität und Biodegradation stimulieren.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Mit Hilfe dieser tierexperimentellen Studie sollte das neue Knochenersatzmaterial, NanoBone[®], auf seine osteoinduktiven Eigenschaften in Hinblick auf seine Nutzung bei Osteosynthesen hin evaluiert werden. Zum Vergleich wurde als Positivkontrolle demineralisierte Knochenmatrix (DBM) und als Negativkontrolle

β -Trikalziumphosphat (β -TCP) herangezogen. Als Modell der Wahl galt hierbei die „Skin- and Muscle-Pouch“-Operation nach Urist. Mittels histologischer Untersuchung wurden die Implantate auf neu gebildeten Knochen, ihre Knochenbedeckung, die Knochensaumdicke, das Auftreten von Zellen, insbesondere von Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen, Plasmazellen und Lymphozyten und das umgebende Gewebe auf allfällige entzündliche Reaktionen hin begutachtet. Mit Hilfe der Fluoreszenzschnitte konnte die Menge des induzierten Knochens, beziehungsweise die Kalziumeinlagerung in diesen, dargestellt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten eine Aussage über die Osteoinduktivität des getesteten Knochenersatzstoffes erlauben.

1.3 Versuchsanordnung

Eine Gruppe von 6 Ratten wurde operiert, um die Osteoinduktivität eines Biomaterials zu eruieren und sowohl gegen eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle zu vergleichen. Hierzu wurden den Tieren drei verschiedene Implantatarten in Muskulatur- sowie Subcutantaschen eingesetzt. Das Implantationsschema wurde so gewählt, dass das neue Material, NanoBone[®], sowie die beiden Kontrollen bestehend aus dem Allograft-Produkt, Nexus IC[®], und dem Kalziumphosphat-Knochenersatzstoff, betaGran[®], bei jeweils 4 der Ratten verwendet wurde. Nach 4 Wochen wurden die Tiere euthanasiert, die Proben gewonnen, aufbereitet und radiologisch und histologisch ausgewertet.

2 Literaturübersicht

2.1 Osteoinduktivität und das Skin-Pouch-Modell als anerkannte Nachweismethode/ die heterotope Implantation

In der Literatur wird der Begriff Osteoinduktivität unterschiedlich interpretiert, daher soll der Begriff wie er in dieser Arbeit verstanden wird, erläutert und abgegrenzt werden. *Osteoinduktivität* ist der Prozess der Rekrutierung unreifer mesenchymaler Stammzellen und deren Differenzierungsbeginn in Richtung der knochenbildenden Zelllinie durch Präsenz eines stimulierenden Faktors⁷⁻¹⁰. Im Gegensatz dazu beinhaltet *Osteogenität* die Bereitstellung von knochenbildenden Zellen aus dem Knochenmark¹¹⁻¹³, *Osteokonduktivität* ist die Infiltration einer porösen Struktur mit Zellen und Nährstoffen mit resultierender Knochenneubildung entlang eines Leitschienensystems auf der Oberfläche¹⁴⁻¹⁶ und *Osseointegration* ist die feste Anheftung eines Implantates durch direkten Knochen-Implantat-Kontakt^{10,17,18}.

Die ersten Studien zum Prozess der Knocheninduktion lassen sich zurückdatieren auf die Arbeit von Senn 1889, in der er den Einsatz von antiseptischen dekalzifizierten Knochenimplantaten zur Heilung von Knochenerkrankungen beschreibt¹⁹. Die ersten klassischen Experimente zur Knocheninduktion wurden von Huggins 1930 mit der Transplantation von Harntraktepithel in Muskelgewebe durchgeführt^{20,21}. Anschliessend erkannte man, dass andere Epithelialzellen²²⁻²⁴ die gleichen Eigenschaften besitzen und dass Knochenfragmente, Dentin oder Knochenextrakte²⁵⁻²⁷, die in extraskelettale Stellen transplantiert wurden ebenfalls Knochenbildung induzieren. Die Funde verleiteten zu der Annahme, dass Knorpelgewebe einen endogenen Faktor enthält, der die ektopische Bildung von Knochen reguliert und kontrolliert²⁸⁻³¹. Mitte des letzten Jahrhunderts zeigte Urist, dass bei der heterotopen Implantation von demineralisierter Knochenmatrix (DBM) in Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen diese neuen Knochen entstehen ließ und dies auf ein in der Matrix enthaltenes osteoinduktives Agens zurückzuführen ist, welches er Bone Morphogenetic Protein (BMP) nannte⁷. Hierauf begannen unter anderem Urist et al., und Burwell et al. sich mit dem Phänomen der Osteoinduktivität, den involvierten zellulären und umgebungsbedingten Faktoren, ihrer Reproduzierbarkeit und der Suche nach einer standardisierbaren Nachweismethode zu beschäftigen^{7,32-36}. Die drei grossen Phasen der Induktion sind *i)* die Chemotaxis, also die direkte Migration von Zellen entlang eines chemischen Gradienten zum Implantationsort, *ii)* die Mitose einhergehend mit der

Proliferation der gerade angehefteten Mesenchymalzellen und gleichzeitig ablaufender vaskulärer Invasion und *iii*) die nachfolgende Differenzierung von Knorpelzellen, der Kondensation von Grundsubstanz auf der Oberfläche des Implantates und die Ausdifferenzierung von Knochenzellen sowie der Mineralisation der kalzifizierbaren, extrazellulären durch Osteoblasten produzierten Matrix³⁶⁻⁴⁴. Lange wurde angenommen, dass die Knorpelkalzifizierung zur Knochenbildung führt, aber genauere Untersuchungen der temporären Ereignisse deckten andere Mechanismen auf. Caplan⁴⁵ berichtet, dass eine Schicht aus osteogenetischen Zellen das Implantat bedeckt, diese Zellschicht in engem Kontakt mit den einwachsenden Kapillaren steht und das erste Osteoid produziert. Dieses Osteoid wird auf der Oberfläche der Implantate mineralisiert und durch Knochenmark ersetzt⁴⁶. Es wurden verschiedenste Präparationsvarianten mit sauren, bzw. basischen Lösungen, Chelatbindern, Fixierlösungen, unterschiedlichen Zeiträumen und Temperaturen, physikalische Agenzien und deren Einfluss auf die Möglichkeit zur Knocheninduktion der demineralisierten Matrix untersucht^{32-34,47,48}. Auch die osteogene Kompetenz von Mesenchymalzellen aus den verschiedenen Organen und Geweben des Körpers wurde erforscht sowie die Zusammensetzung der DBM als auch ihrer Extrakte^{36,49-53}. Diese weiterführenden Studien suggerierten, dass demineralisierte Knochenmatrix neben dem entdeckten BMP weitere morphogenetische Faktoren beinhaltet^{7,54-60}. So erkannte man bald, dass von Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) die Rede sein musste, von denen bis heute 18 Isoformen entdeckt wurden. Auch andere osteogenetische Proteine sowie unspezifischere Wachstumsfaktoren (FGF, IGF, OGP, PDGF; TGF) wurden extrahiert, isoliert, gereinigt und identifiziert^{43,53,58,61-66}. Obwohl bewiesen werden konnte, dass BMPs zu einer irreversiblen Induktion der Differenzierung von Zellen des Mesenchymaltyps zu Knochenvorläuferzellen und der daraus resultierenden Knorpel- und Knochenformation führen^{37,67-70}, ist trotz intensiver Forschung der exakte Mechanismus der Osteoinduktion durch verschiedenste Gewebstypen bis heute nicht vollständig aufgeklärt⁷¹, zumal die Suche nach Erklärungen für den Osteoinduktionsprozess durch die Arbeit von Winter und Simpson zusätzlich verkompliziert wurden. Sie konnten die ektopische Knochenbildung durch einen synthetischen Schwamm nachweisen, der weder BMPs enthielt noch diese produzierte⁷². Die Autoren beobachteten eine der Osteoinduktion vorausgehende *in vivo* Kalzifikation der synthetischen Schwammoberfläche, die sie zu der Vermutung veranlasste, dass sowohl die chemische Zusammensetzung und somit das Dissolutionsverhalten als auch die Geometrie des Implantates von Bedeutung für die

Initiierung der Knocheninduktion sein könnten. Auch in früheren Berichten wurde Knochenbildung durch Sehnen und Arterien nach vorangegangener Kalzifizierung *in vivo* beobachtet⁷³. Seitdem wurden einige Studien publiziert, in denen über die Implantation verschieden zusammengesetzter Kalziumphosphatkeramiken, Kalziumphosphatzemente oder Coatings, aber auch Glaskeramiken, Aluminiumkeramiken und Titan berichtet wurde, welche ebenfalls Knochenneubildung hervorruft⁷⁴⁻⁸³. Obgleich so der Beweis erbracht wurde, dass BMPs und Knochenersatzmaterialien zu ektopischer Knochenentstehung führen, ist unklar, ob der Mechanismus derselbe ist¹³. Der typische Prozess der enchondralen Ossifikation bei dem auf Knorpel als Vorläufer die endgültige Knochenbildung folgt und der durch BMPs ausgelöst wird^{52,84,85}, wurde bei der Osteoinduktion durch Biomaterialien nie beobachtet^{78,82,86-89}. Weitere Unterschiede zwischen Biomaterial- und BMP-induzierter Knochenbildung sind, dass erstere in kleinen Tieren wie Nagern sehr selten⁹⁰⁻⁹², aber BMPs sicher Knochen induzieren^{63,64,93,94} und dass Knochenneubildung immer in den Poren des Materials und nie in dessen Peripherie beobachtet wurde, im Gegensatz zur Knochenformation ausserhalb des und in der Distanz zum Carrier bei der BMP-induzierten Variante⁹⁵⁻⁹⁷. Des Weiteren war und bleibt Gegenstand vieler Forschungsarbeiten die Frage warum einige Knochenersatzstoffe osteoinduktiv sind und was exakt ihre osteoinduktiven Eigenschaften ausmacht.

Als gängigstes Tiermodell des Nachweises der Osteoinduktivität eines Stoffes gilt die chirurgische Implantation in eine heterotope Seite, wobei vor allem die intramuskuläre und subkutane, seltener die intraperitoneale und mesenteriale Lokalisation genutzt werden, um induzierte heterotope Ossifikation nachzuweisen⁹⁸⁻¹⁰³. Diese Methode wurde durch Marshall Urist und Kollegen eingeführt, die auf diese Weise in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts die osteoinduktiven Fähigkeiten von DBM und ihrer Extrakte nach intramuskulärer und subkutaner Implantation in Nagern bewiesen haben^{7,54}. Die Experimente wurden von Urist und anderen Forschern erweitert, um die Knocheninduktion durch demineralisierte Knochenmatrix und deren Matrixextrakte zu belegen, das Vorkommen in verschiedenartigen Säugetieren zu demonstrieren und zu verifizieren, dass der heterotop gebildete Knochen durch enchondrale Ossifikation entsteht^{7,9,54,58,64,70,104,105}. Im Gegensatz zur orthotopen Implantation eines Transplantates oder Knochenersatzstoffes können Einflüsse durch die direkte Nachbarschaft zum Knochengewebe und somit die Wirkung von im Knochen enthaltenen osteogenen Zellen, BMPs und lokalen Wachstumsfaktoren wie Transforming Growth Factor β ,

Insulin-like Growth Factors, Platelet derived Growth Factors, Fibroblastische Wachstumsfaktoren oder Osteogenic Growth Peptide¹⁰⁶ bei der heterotopen Einbringung in normalerweise osteogenetisch inkompetenten Geweben ausgeschlossen werden, so dass diese Nachweismethode zur Demonstration von osteoinduktiver Aktivität bevorzugt herangezogen wird¹⁰⁷. Forschergruppen implantierten unterschiedlichste Biomaterialien heterotop, verglichen ihre Wirkung in verschiedenen Tierarten und erkannten, dass Kalziumphosphatmaterialien osteoinduktiv sein können und diese Eigenschaft jedoch materialbezogen^{78,81,88,97,108-110} und tierartenabhängig ist^{81,92,109,111,112}. Osteoinduktivität von Kalziumphosphaten wurde in Kaninchen, Schafen, Ziegen, Schweinen, Hunden, Affen und Pavianen demonstriert^{75,87,89,113-116}. Zudem wurde der Einfluss der Implantatgrösse auf die Menge des induzierten Knochens untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass grössere Implantate im Vergleich höhere Knochenmengen induzierten⁷¹. Auch der Effekt auf die Lokalisation der Implantate wurde analysiert und die Beobachtung gemacht, dass die intramuskuläre Implantation eine höhere Knocheninzidenz vorweist^{71,92}. Im Gegensatz dazu konnten Gosain⁷⁸ *et al.* keinen signifikanten Unterschied zwischen intramuskulärer und subkutaner Implantation feststellen. Allerdings ist ein Vergleich der Studien schwierig, da unterschiedliche osteoinduktive Materialien verwendet wurden und sowohl die Beobachtungszeiträume der Implantate als auch die Tiermodelle verschieden waren. Erschwerend kommt hinzu, dass die Knocheninduktion neben des Unterschieds der Tierspezies auch tierindividuell differiert^{71,89}. Darüber hinaus liefen und laufen Versuche zum Verhalten der verschiedenen Transplantate und Implantate in Knochendefekten, „critical size defects“ und Augmentationen. So unterstützen Kalziumphosphatmaterialien die Proliferation von osteogenetischen Zellen, die Differenzierung^{91,117} und die Knochenbildung in knöchernen Stellen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Osteoinduktivität eines Materials zur schnelleren Heilung führt und somit eine klinische Relevanz besitzt¹¹⁸⁻¹²⁰.

2.2 Knochenzusammensetzung und Heilung

Das Skelettsystem des Säugetiers ist der stützende, Last aufnehmende und Form bzw. Schutz gebende Teil des Bewegungsapparates⁵. Entsprechend seiner Funktion muss das Gewebe Druck-, Zug- und Scher/ Torsionskräften standhalten und dementsprechend Stabilität gepaart mit einer gewissen Elastizität mitbringen. Dies wird durch eine spezielle Architektur und Komposition des Knochens gewährleistet¹²¹. So ist der

Knochen ein Organ aus einer Gewebekomposition, die das Knochengewebe an sich sowie blutbildendes Knochenmark, Knorpel, Binde-, Fettgewebe und Nerven- und Gefäßsysteme umfasst. Natives Knochengewebe ist ein Verbund aus 65% anorganischem Mineral, 25% organischem Anteil und 10% Wasser. Der organische Anteil lässt sich weiter aufgliedern in 98% avitale Knochenmatrix und ca. 2% vitale Zellen. Die Knochenmatrix wiederum besteht aus 95% Kollagen der Typen I, V, VIII und XII und 5% nichtkollagene Matrix, die 4,9% amorphe Grundsubstanz aus Proteoglycanen, Glycoproteinen, Serumproteinen und anderen mehr sowie 0,1% Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (GDFs) umfasst^{5,122}.

Das starre Knochenmineral, das dem Knochen seine Druckfestigkeit verleiht, setzt sich zum größten Teil aus schwer löslichen Kalziumsalzen zusammen, zu meist Kalziumphosphate, deren Hauptanteil als Hydroxylapatit vorliegt. Der Hydroxylapatit-Kristall setzt sich aus $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ -Zellen zusammen, wobei verschiedene Metallkationen bzw -anionen das Kalzium bzw die Hydroxylgruppe oder das Phosphation substituieren können¹²³⁻¹²⁶. Reifer mineralisierter Knochen mit seinem anorganischen Mineralanteil entsteht durch die Einlagerung der Mineralien in die organische Knochensubstanz, das so genannte Osteoid¹²⁷.

Der organische Anteil, die Knochenmatrix vermittelt dem Knochen seine Zug- und Biegebelastbarkeit und besteht, wie oben bereits erwähnt, vor allem aus dem stäbchenförmigen Faserprotein Kollagen und dies im überwiegenden Anteil an interstitiellen Kollagen Typ I und zu geringem Anteil an Typ III^{121,128,129}. Den fehlenden Anteil der Knochenmatrix macht die nichtkollagene Matrix aus, welche die unstrukturierte amorphe Knochengrundsubstanz bestehend aus Proteoglycanen, Glycoproteinen, Phosphorproteinen, diversen Polypeptiden als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und Serumproteinen bildet¹³⁰⁻¹³³. Des Weiteren sind in der Knochenmatrix osteoinduktive Faktoren, die „bone morphogenetic proteins“ (BMP), enthalten, die primär nicht-osteogene Zellen in osteogene Zellen transformieren und somit Knochenneubildung induzieren können^{7,134-138}. In die Knochengrundsubstanz eingebettet liegen die untereinander verzahnten Kollagenfasern und Osteozyten, die miteinander über die Podozyten und deren Zellrezeptoren, so genannte Integrine, in Verbindung treten^{139,140}. Der Anteil an Zellen wird vor allem von spezialisierten Knochenzellpopulationen gestellt, die sich in Lokalisation, Morphologie und Funktion unterscheiden und als Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten bezeichnet werden¹²¹. Der gesunde Knochen unterliegt physiologischer

Weise einem ständigen Remodelling, das bedeutet, dass immerzu ein Knochenumbau mit vorausgehender Knochenresorption und folgendem Knochenaufbau von statten geht¹⁴¹⁻¹⁴⁴. Osteoblasten, die Knochen bildenden Zellen, synthetisieren und sezernieren die Knochengrundsubstanz, in die Kollagen eingelagert wird^{145,146}. Hiernach erfolgt die Mineralisation des gebildeten Knochengewebes durch Matrixmodifikation, Kristallentstehung, -wachstum und Umgestaltung¹⁴⁷. Im reifen Knochen liegen diese Knochenlamellen konzentrisch geschichtet um die zentral gelegenen Havers'schen Kanäle, welche die ernährenden Blutgefäße führen und gemeinsam ein Osteon bilden¹⁴⁸. Zwischen diesen Lamellen liegen die reifen Osteozyten, die untereinander über Zellfortsätze in Verbindung stehen und über diese auch vom Havers'schen Kanal ausgehend ernährt werden. Sie stammen von den Osteoblasten ab und werden durch deren Inkorporation in die Knochenmatrix geschaffen¹⁴⁹. Osteozyten beeinflussen die Funktion von Osteoblasten und Osteoklasten, infolgedessen den Knochen-Turnover und sind für die funktionelle Knochenadaptation auf mechanische Belastung zuständig¹⁵⁰. Die Havers'schen Kanäle werden durch quer verlaufende so genannte Volkmann-Kanäle miteinander verbunden. Die für den Knochenabbau zuständigen mehrkernigen Zellen werden Osteoklasten genannt¹⁵¹. An speziellen Zellmembranarealen, die lysosomale Kompartemente beinhalten, findet die Knochenresorption statt, in dem der saure pH das Mineral löst und proteolytische Enzyme die Matrix verdauen¹⁴⁵. Dieser Prozess läuft in ähnlicher Weise auch bei der Frakturheilung ab und die hierfür wichtige zelluläre Komponente sind die bereits erwähnten Osteoblasten, ihre Vorläufer die Osteoprogenitorzellen und das Havers'sche Kanal-System⁵.

Somit besitzt das Knochengewebe ein sehr gutes Regenerationsvermögen und die vollständige Ausheilung einer Verletzung, eine so genannte „*Restitutio ad integrum*“, ist die Regel. Man unterscheidet zwischen primärer oder Kontaktheilung und sekundärer oder Spaltheilung. Bei erstgenannter kommt es zur knöchernen Überbrückung eines sehr engen Bruchspaltes durch direkte Aussprossung der Blutgefäße und dem Auswachsen der Osteone ohne dass eine Kallusbildung zu beobachten wäre¹⁵²⁻¹⁵⁴. Bei zweit erwähnter folgt auf die Hämatombildung unter Freisetzung verschiedenster Faktoren aus Thrombozyten¹⁵⁵ und der daraus resultierenden chemotaktischen Anlockung von verschiedensten Zellen wie neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und anderen¹⁵⁶⁻¹⁵⁸, dessen Resorption und die gleichzeitige Auffüllung des Frakturspaltes mit Granulationsgewebe durch Gefäßeinsprossung und Einwanderung

von Fibroblasten¹⁵⁹. Das Granulationsgewebe reift und wird in Bindegewebe transformiert, das kollagenfaserhaltig ist¹⁶⁰. Während des Abbaus nekrotisch gewordener Knochenfragmente abgegebene Wachstums- und Differenzierungsfaktoren⁴³ wirken auf die eingewanderten Mesenchymalzellen, die residenten Osteoprogenitorzellen, die Osteoblasten^{161,162} und auch die Osteoklasten¹⁶³. Stadium abhängig exprimieren die beteiligten Zellen in unterschiedlichem Ausmaß Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sowie BMP^{43,164-168}. Eine Knorpelmanschette wird gebildet, deren Mineralisation im Nachfolgenden von statten geht. Hierauf findet ein durch Chondroklasten vorangehender Knorpelabbau unter gleichzeitigem Ersatz von Geflechtknochen durch Osteoblasten, für deren Differenzierung BMP eine entscheidende Rolle spielt¹⁶⁹, statt. Dabei wird der gebildete Knochen an den Wänden der Resorptionszwischenräume abgelegt und so neue Knochen trabekel geformt. Durch weitergehende Knochen deposition in Kombination mit lokalem Abbau kommt es zum Umbau in lamellären Knochen. Nach Wiederherstellung der Knochenmarkshöhle bei Röhrenknochen ist der Heilungsprozess abgeschlossen¹⁷⁰. Somit ist der Knochenheilungsprozess eine in sukzessiven Abschnitten voranschreitende Prozedur, die durch einen multizellulären Mediatorenmechanismus unterhalten wird¹⁶³.

2.3 Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien in der Knochenchirurgie

In der Geschichte der Knochenchirurgie kann auf eine lange Suche nach einem den Knochendefekt stabilisierenden, die Heilung unterstützenden und gut zu verarbeitenden Material zurückgeblickt werden. Seit der 1668 erschienenen Beschreibung über die Verwendung von Knochentransplantaten durch van Meekeren^{171,172} liefen die ersten Versuche eine schnellere und komplikationslose Frakturheilung durch den Einsatz von autologem Knochen zu erreichen^{173,174}. Die ersten Versuche lieferten hoffnungsvolle Ergebnisse^{173,175,176} doch schon bald mussten sich die Kliniker die Begrenztheit der Materialverfügbarkeit und verschiedenste weitere Problematiken eingestehen. Im Zuge des klinischen Fortschritts und durch die Suche nach Alternativen gelang es allo- und xenogene Knochentransplantate sowie verschiedenste körperfremde, synthetische Materialien herzustellen, die teils sehr gute Ergebnisse erzielten¹⁷⁷⁻¹⁸⁰. Doch keines von ihnen vereinigt in sich die gewünschten osteointegrativen, -konduktiven, -induktiven und osteogenen Fähigkeiten des autologen Knochentransplantates¹⁸¹.

2.3.1 Knochentransplantate

Knochentransplantate sind die ersten bei der Osteosynthese zur Heilungsunterstützung eingesetzten Mittel^{172,182} und haben einen ausgezeichneten Ruf in der veterinär-^{183,184} und humanmedizinischen¹⁶ chirurgischen Therapie erlangt. Sie sind knocheneigenen Ursprungs und stammen entweder vom Patienten selbst (Autografts), von der Patientenspezies (Allografts) oder sind speziesfremd (Xenografts)¹⁸⁵. Sie werden je nach Indikation entweder aus den Extremitätenknochen, dem Stammskelett oder seltener dem Schädelknochen entnommen. Das Knochentransplantat und die transplantatempfangende Stelle sind die Heilung und Inkorporation beeinflussenden Faktoren¹⁸⁴. Das anfängliche das Transplantat umgebende Hämatom wird resorbiert und fortschreitend durch fibrovaskuläres Gewebe ersetzt. Die transplantateigenen Osteozyten sterben grösstenteils ischämisch bedingt ab, so dass das Transplantat als ein Gerüst für die körpereigenen einwandernden mesenchymalen Stammzellen und Kapillaren zur Verfügung steht. Unter der Wirkung lokaler Faktoren differenzieren sich die Mesenchymalzellen zu Osteoblasten. Mit voranschreitender Vaskularisierung treten zunehmend Osteoklasten auf, die im Zuge des physiologischen Remodellings das Transplantat durch lamellären Knochen ersetzen^{184,186}. Dieser grundlegende Prozess wurde erstmals 1893 von Barth beobachtet und als „schleichender Ersatz“ beschrieben^{174,187} und später von Phemister 1914 als „creeping substitution“ aufgegriffen¹⁸⁸.

Autografts haben den Vorteil, dass sie nicht als körperfremd angesehen werden, somit keine immunologischen Abwehrreaktionen hervorrufen^{189,190}, progressiv in das Skelett inkorporiert werden, biokompatibel sind und eine hohe biologische Wertigkeit besitzen: das heißt sie verfügen über die dem Knochen eigenen Eigenschaften¹⁹¹⁻¹⁹⁵. Daher gelten sie bis heute als Goldstandard^{2,4,196-198}. Ihr Nachteil besteht in der zusätzlichen Operation, der dadurch verlängerten Operationsdauer mit erhöhtem Narkoserisiko und allen möglichen Komplikationen, ihrer begrenzten Verfügbarkeit, damit eventuell einhergehender nicht ausreichender Stabilisierungsmöglichkeit und der massgeblich erhöhten Morbidität, die sich auf Blutverlust, verschiedenste Wundheilungsstörungen bzw. –infektionen, Hypersensivität, lokalen sensorischen Verlust und chronische Schmerzen bezieht sowie der Verlust an Knochenvolumen an der Entnahmestelle und daraus resultierender Probleme wie Frakturen¹⁹⁹⁻²⁰⁵.

Allografts offerieren die gleichen Charakteristika wie Autografts. Allerdings wirkt sich der technische Aufbereitungsprozess, dem sie unterzogen werden um das Risiko

immunologischer Reaktionen möglichst zu vermeiden^{206,207}, reduzierend auf ihre osteokonduktiven und osteoinduktiven Effekte im Vergleich zum Autograft aus und ihnen fehlt grösstenteils die Osteogenität^{194,208,209}. Ihre Vorzüge beinhalten neben dem Vermeiden der mit der Knochengewinnung assoziierten zusätzlichen Operation und Morbidität einen hohen Grad an Verfügbarkeit, gute Inkorporation, sie sind nicht toxisch und halten eine lange Zeitspanne²¹⁰. Als Nachteile der Allografts sind immunologische Abwehrreaktionen des Donors, Frakturen, Infektionen, Pseudarthrosen und das potentielle Risiko einer Krankheitsübertragung zu sehen^{4,211,212}.

Xenografts besitzen nahezu die gleichen Eigenschaften und Vorteile wie Allografts. Nachteilig wirken sich bei ihnen die leicht auslösbare immunologische Reaktion des Donors auf das körperfremde Material und der Transfer von Krankheiten aus^{4,213}.

2.3.2 Knochenersatzmaterialien

2.3.2.1 Allgemeines

Aufgrund der oben genannten Nachteile natürlicher Knochentransplantate und dem Wunsch nach Optimierung der positiven Eigenschaften wurde eine Vielzahl synthetischer Knochenersatzmaterialien entwickelt²¹⁴. Der Vorteil synthetischer Knochenersatzmaterialien beinhaltet Erhältlichkeit, Sterilität und reduzierte Krankheitsziffer. Die heute in der Osteosynthese gebräuchlichen Knochenersatzstoffe sind organischen oder synthetischen Ursprungs. Sie sind von hoher Biokompatibilität, in der Regel mittels Biodegradation und oder –resorption abbaubar, besitzen eine gute Biomechanik, Osteoaffinität, Osteointegration und osteokonduktive Eigenschaften. Je nach genutztem Material können sie osteoinduktiv und/oder osteogen sein. Ein ideales Knochenersatzmittel sollte sowohl Osteointegration, Osteokonduktion als auch Osteoinduktion und Osteogenität kombiniert als Charakteristika aufweisen^{191,194,215}. Die verschiedensten Materialien vereinigen unterschiedliche Eigenschaften. Dennoch sind sie in ihrer biologischen Effizienz den Knochentransplantaten unterlegen. Zu den weiteren Eigenschaften, die an Knochenersatzmaterialien gestellt werden, gehören gute Modellierbarkeit und Formstabilität. Ausserdem sollten sie chemisch inert sein, keine Hypersensitivität oder Fremdkörperreaktionen auslösen und entweder mit Knochen durchbaut oder durch diesen ersetzt werden können²¹⁶. Man kann sie nach Ursprung bzw. Herstellungsverfahren in 4 Klassen einteilen¹⁹⁶:

- I. biologisch, organische Substanzen
 - Knochenmatrices und –extrakte
 - extrahierte Knochenwachstumsfaktoren
 - Kollagen/ Fibrinmatrix
- II. synthetische, anorganische Materialien
 - Kalziumphosphatkeramiken
 - Biogläser, Glaskeramiken
- III. synthetische, organische Verbindungen
 - Polymere (Polyester, Polyanhydride, Polyorthoester)
 - Polyurethan
- IV. Composites
 - Kompositionen aus vorher genannten Knochenersatzmaterialien

Das Knochenersatzmaterial, das in dieser Studie auf seine osteoinduktiven Eigenschaften hin getestet werden soll, gehört zur Gruppe II.

2.3.2.2 Kalziumphosphate

Kalziumphosphate stellen eine wichtige Gruppe der synthetischen Knochenersatzstoffe und sind seit 1920 in klinischem Gebrauch²¹⁷. Sie werden entweder durch einen thermischen Herstellungsprozess, einer Sinterung, oder durch Präzipitation aus einer wässrigen Lösung gewonnen²¹⁸. Ihr Abbauverhalten wird vor allem durch ihre Löslichkeit in Wasser bestimmt. Aber auch ihre Porosität, Kristallgrösse und das Verhalten in saurem Milieu nehmen Einfluss^{2,219}. Zu den gebräuchlichen Kalziumphosphaten gehören Hydroxylapatit (HA) ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), α - (α -TCP) (α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), β -Trikalziumphosphat (β -TCP) (β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) sowie Dikalziumphosphat (DCP) ($\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2$). Hydroxylapatit kann sowohl synthetischen als auch organischen Ursprungs sein und ist vom Aufbau und stöchiometrischen Faktor her nahezu identisch dem Hydroxylapatit des Knochens². Es ist schwer und sehr langsam oder nicht degradierbar^{4,220,221} und besitzt eine gute mechanische Eigenschaft. Neben seiner Osteoaffinität ist es osteointegrativ und –konduktiv^{2,177,220,222,223}.

β -TCP verfügt über die gleichen Eigenschaften wie Hydroxylapatit ist allerdings schneller abbaubar^{177,218,224,225}. Der Abbau findet häufig vor allem durch Makrophagen statt²²⁶. Wenn die Resorption zügiger abläuft als neuer Knochen entsteht¹⁸⁰, kommt es zu Stabilitätsverlust, eventueller Entzündung und bindegewebiger Reaktion sowie

mangelnder Knochenbildung¹⁹⁶. Des Weiteren ist β -TCP dem Knochen weniger ähnlich. Generell besitzen Kalziumphosphate auch wenn sie in Komposition und Form variieren eine gute Biokompatibilität, sind weder lokal noch systemisch toxisch, besitzen kein kanzerogenes oder Entzündung hervorrufendes Potential und sind antigenetisch inaktiv^{2,4,177,216}. Eine weitere positive Eigenschaft der Kalziumphosphatverbindungen ist ihre Bioaktivität, d. h. ihr Vermögen eine direkte, anhaftende und stabile Bindung zum Knochen zu entwickeln²²⁷, in dem sie eine kalziumphosphatreiche Mikrokristallschicht auf ihrer Oberfläche an der Grenzfläche zum Knochen bilden^{228,229}. Hydroxylapatit- und β -TCP-Keramiken sind einzeln oder in Kombination in dichter oder poröser Form als Blöcke oder Granulate erhältlich^{75,230,231}. Sie eignen sich für den Einsatz in nicht tragenden oder mechanisch wenig belasteten Bereichen wie zur Defektauffüllung, Augmentation und Rekonstruktion in der kranio-maxillo-faszialen^{232,233}, der Zahn²³⁴ - und Traumachirurgie²³⁵, der Wirbelsäulenchirurgie und in der Orthopädie^{4,180,236}. Kalziumphosphate müssen mit einer stabilisierenden Osteosynthese kombiniert werden, da sie unter Zug – und Scherkräften zu weich und brüchig sind²³⁷. Eine weitere Problematik liegt in der Verarbeitung, denn die Blöcke müssen ausserhalb des Körpers an die Defektgeometrie angepasst werden, was einen unvollständigen Knochen-Implantatkontakt zur Folge haben kann²³⁸. Die Granulate müssen in den Defekt gepresst werden²³⁹ und es besteht die Gefahr einer Implantatmigration aus diesem Gebiet⁴.

Die Osseointegration und Osteokonduktivität der Kalziumphosphatkeramiken wird durch ihre Porosität bestimmt²⁴⁰, die sich aus der Grösse und Anzahl der Poren und ihrer Interkonnektion ergibt, denn sie beeinflusst die Zelleinwanderung und Gefässeinsprossung in das Implantat und die Zirkulation von nutritiven Stoffen^{1,241,242}. Die optimale Porengrösse, -dichte und -interkonnektion war bereits Gegenstand vieler Studien²⁴³⁻²⁴⁸. So erlaubt ein Porendurchmesser von $100\mu\text{m}$ das Einwachsen von knöchernem Gewebe²⁴⁹, eine Porengrösse von $1\mu\text{m}$ erlaubt Bakterien die Materialbesiedlung und ab $50\mu\text{m}$ können Makrophagen eindringen, was zu einer Erhöhung der Infektionsresistenz führt²⁵⁰. Porenverbindungen ab $50\mu\text{m}$ lassen das Einwachsen von Blutgefässen mit nachfolgender Resorption zu²²². Lange wurde die allgemein gültige Meinung akzeptiert, dass Kalziumphosphatkeramiken biokompatibel, osseointegrativ und osteokonduktiv sind jedoch keinerlei osteoinduktive Eigenschaften besitzen. Andererseits wurden in mehreren Studien sehr wohl eine Knocheninduktion von Kalziumphosphatmaterialien nach der Implantation in Weichteilgewebe

beobachtet^{72,75,78,81,83,88,111,251}. Diese osteoinduktive Eigenschaft scheint mit der speziellen Geometrie dieser Verbindungen assoziiert zu sein²⁵²⁻²⁵⁴.

2.3.3 Osteoinduktive Knochenersatzmaterialien

Obwohl erfolgreiche Resultate mit Knochenersatzmaterialien in der Frakturheilung und dem Knochenersatz erzielt wurden, sind sie nicht vergleichbar mit Autografts und deren osteoinduktiver Aktivität. Daher gab es grosse Bemühungen, um Knochenersatzstoffe mit Osteoinduktivität auszustatten. Dieses neue Forschungsfeld wird häufig mit „Drug targeting“²⁵⁵ oder „tissue engineering“ in einem Atemzug genannt, wobei letzteres definiert wird als „interdisziplinäres Feld, das die Prinzipien des engineering und der life science in Richtung der Entwicklung von biologischen Ersatzstoffen anwendet, die die Gewebefunktion erneuern, aufrechterhalten oder verbessern“²⁵⁶. Ein Weg osteoinduktive Materialien zu erstellen, besteht in der Einbringung von Differenzierungs- oder Wachstumsfaktoren wie den Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) innerhalb oder als Coating auf das Implantat. Hierzu liefen zahlreiche Studien mit unterschiedlichen Tiermodellen²⁵⁷⁻²⁶⁰ und verschiedensten Trägerstoffen^{252,261-265} sowie BMP-Dosierungen^{266,267}, die gute Resultate zeigten. So sind BMPs in allen Spezies erfolgreich in ihrer Wirkung als Knocheninduktoren, aber die Dosis zur Knochenformation variiert je höher das Tier in der Entwicklung steht, so dass von den in Tierexperimenten erhaltenen Ergebnissen nicht direkt auf das Verhalten der BMPs im Menschen geschlossen werden kann^{259,260,268}. Eine andere Variante zur Osteoinduktivität zu gelangen, ist das so genannte „bone tissue engineering“, bei dem osteogenetisch kompetente Zellen in oder auf das Implantat aufgebracht werden^{256,260,269}. Neben Knochenmark oder Periost an sich kommen *in vitro* angezüchtete Stammzellen des Knochenmarks, Zellen des Periosts oder Chondrozyten als osteogenetische Zellen für das bone tissue engineering in Frage²⁷⁰⁻²⁷². Der labortechnische Aufwand für diese Art von Osteoinduktion ist relativ hoch, sodass nach wie vor ein grosser Bedarf an weiteren Studien besteht, die Antworten nach dem richtigen Implantatmaterial²⁷³, der Ernährung der Zellen und praktischer Probleme wie Sterilisation und Transport liefern. Des Weiteren wurde festgestellt, dass sowohl die Chemie als auch die Struktur des Knochenersatzmaterials eine Rolle bei der Entfaltung einer Aktivität von Osteoinduktivität spielen. Das Augenmerk wird deshalb vermehrt auf die Optimierung dieser Faktoren gerichtet¹⁰⁷. Neben der separaten Beladung einer geeigneten Matrix ist

auch eine Kombination von osteoinduktiven Wachstumsfaktoren und/oder Osteoprogenitorzellen mit einer osteokonduktiven Matrix möglich²⁷⁴⁻²⁷⁶.

Neben diesen Varianten an osteoinduktiven Composites wurden im Laufe der Jahre immer wieder von Osteoinduktion durch Kalziumphosphatknochenersatzstoffe berichtet^{82,108,114,277}. Diese Ergebnisse ebneten den Weg für die Suche nach der Ursache dieses Phänomens und den genau ablaufenden Prozess der Induktion durch Kalziumphosphatbiomaterialien. So erweckt es den Anschein, dass neben der chemischen Zusammensetzung auch die physikalische Beschaffenheit des Implantates in Kontakt mit den undifferenzierten Vorläuferzellen von grosser Bedeutung ist^{278,279}. Da die Zusammensetzung des Implantates sein Dissolutionsverhalten und somit seine zu entfaltende Bioaktivität bestimmt, ist es für den Induktionsprozess, bei dem die Präzipitation einer biologischen Kalziumphosphatschicht auf der Oberfläche der Kalziumphosphatmaterialien eine Rolle zu spielen scheint⁷², von Wichtigkeit. Für die Bildung dieser Schicht an der Grenzfläche zwischen Knochen und Implantat wird ein zellvermittelter Dissolutions- und Präzipitationsprozess verantwortlich gemacht²⁸⁰⁻²⁸². Infolge dessen werden durch die zelluläre Aktivität Kalzium- und Phosphationen in die Mikroumgebung freigesetzt. Diese werden mit anderen Ionen aus der Körperflüssigkeit zu Mikrokristallen komponiert, die einen innigen Verbund mit einer organischen Komponente auf der Oberfläche der Kalziumphosphatmaterialien eingehen²⁸³. Diese initiale Anreicherung der Mikroumwelt scheint die Knochenmineralisation und -bildung zu begünstigen²⁸⁴. Des Weiteren wird vermutet, dass einhergehend mit dem Präzipitationsprozess auch zirkulierende endogene Proteine unter anderem die Bone Morphogenetic Proteins gebunden und in diese Schicht inkorporiert werden und so der osteoinduktive Prozess in Gang gesetzt wird^{89,253,285-287}. Das Ausmass der Dissolution hängt neben dem Kompositionsverhältnis von Hydroxylapatit zu β -TCP von physikalischen Grössen wie der Partikelgrösse, der Makro- und Mikroporosität, der spezifischen Oberfläche und der Kristallinität ab^{71,75,288,289}. *In vivo* Studien zeigten, dass generell der Materialstruktur eine entscheidende Rolle zu zukommen scheint, wobei sowohl die Struktur der Makroporen als auch die mikroporöse Oberfläche von Bedeutung sind^{82,83,89,110,254}. Beobachtungen von Knocheninduktion wurden nie auf ebenen Oberflächen, sondern an Kalziumphosphatmaterialien mit poröser oder Höhlungen enthaltender Makrostruktur gemacht^{71,114,254,278}. Ausserdem konnte berichtet werden, dass Kalziumphosphatkeramiken mit Oberflächenmikroporosität und mikroporöse Beschichtungen von Metallimplantaten im Gegensatz zu solchen mit

dichter Oberfläche der Makroporen oder glatter Beschichtung Knochenbildung hervorrufen^{76,77,88,290,291}. Ferner konnte ektopische Knochenbildung durch Kalziumphosphatgranulat mit mikroporöser Oberfläche demonstriert werden. Die Autoren vermuten, dass die Mikroporen in den Makroporen neben der Erhöhung der Oberfläche für den Ionenaustausch auch als Kristallisationskern für die Präzipitation des Kalziumphosphats dienen und ausserdem die Oberfläche des Materials signifikant zunehmen lässt, was die Proteinadsorption und Zelladhäsion steigert und somit den Prozess der Knochenbildung positiv beeinflusst^{75,292}. Eine weitere Voraussetzung für die Entstehung ektopischen Knochens ist die Interkonnektion der Poren eines Implantates, um die Vaskularisation mit einhergehender Bereitstellung von Sauerstoff, Nährstoffen, Zellen und Signalmolekülen zu gewährleisten. Begleitet durch die Bereitstellung findet eine gleichzeitige Freigabe von Kalzium- und Phosphationen statt, was als Ursprung der biologischen Aktivität der Kalziumphosphatmaterialien angenommen wird^{237,293}. Gefolgt wird diese Freilassung von Ionen von der bereits erwähnten Präzipitation einer biologischen Apatitschicht²⁹⁴, die sich ereignet, wenn die Konzentration von Kalzium- und Phosphationen eine Übersättigung erreicht. Dies könnte den Fakt erklären, dass Knochenbildung immer in den Poren im Zentrum des Implantates und nicht auf dessen äusserer, weniger angereicherten Oberfläche stattfindet²⁹⁵. Diese Kalzifikation ist möglicherweise ein Vorläufer der Knochenformation und es wird angenommen, dass der Präzipitationsmechanismus auch bei Materialien, die kein Kalziumphosphat enthalten, *in vivo* von statten geht^{80,279}. Da wie schon erwähnt die Osteoinduktion durch Biomaterialien sich von dem BMP induzierten Prozess der Knochenbildung unterscheidet^{70,106,296-298}, bei dem vor der Knochenformation Knorpelgewebe und Chondrozyten generell vermerkt werden^{72,299}, besteht die Überlegung, dass Mikropartikel von den porösen Keramiken abgegeben werden und eine entzündliche Reaktion mit Zytokinproduktion hervorrufen, die wiederum zirkulierende Stammzellen zur Differenzierung in Osteoblasten stimulieren¹⁰⁸. Dieser Prozess könnte ähnlich dem der Frakturheilung sein und durch den Mechanismus der intramembranösen Ossifikation ablaufen. Diese Hypothese kann durch die Absenz von Chondrozyten in den Studien mit osteoinduktiven Materialien bestätigt werden. Andere Forscher denken, dass die niedrige Sauerstoffspannung in den zentralen Regionen des Implantates eine eventuelle Dedifferenzierung der Perizyten zu Osteoblasten auslöst^{107,300,301}.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sowohl die Makrostruktur entweder über präexistente Makroporosität oder das Vorhandensein interpartikulärer Räume, die

Mikrostruktur durch Mikroporosität, erhöhte Rauigkeit der Oberfläche oder spezifische Mikrotextur als auch die chemische Zusammensetzung, vor allem in Bezug auf das Dissolutionsverhalten der einzelnen Komponenten, eine wichtige Rolle in der Osteoinduktion durch Biomaterialien spielen.

3 Material und Methoden

3.1 Aufbau der Studie

Für diese Studie wurden insgesamt 6 weibliche Ratten der Linie Hsd:RH- Foxn1 rnu verwendet. Die Durchführung der Versuche erfolgte nach den geltenden gesetzlichen Bestimmungen des schweizerischen Tierschutzgesetzes und wurde vom kantonalen Veterinäramt bewilligt (Bewilligungsnummer 54/2007). Jedes dieser Tiere bekam nach einem bestimmten Schema 6 Implantate, je 3 paramedian links und rechts der Wirbelsäule, eingesetzt, wobei 3 unterschiedliche Implantatproben zur Verfügung standen und 2 Implantationslokalisationen genutzt wurden. So erhielten alle Ratten links der Wirbelsäule die Implantate von cranial nach caudal in der Reihenfolge s.c., i.m., s.c. und rechts gelegen i.m., s.c., i.m. (Abb. 1). Bei den Ratten 1 bis 3 kamen jeweils 2 Implantate Nexus IC® (lifeTEK OrthoBiologics, Gainesville, Florida, USA), 2 betaGran® (Orthos` Orthobiologics, Bristol, England) und 2 NanoBone® (Artoss GmbH, Rostock, Deutschland) und bei den Ratten 4 bis 6 je eine der Implantattypen zum Einsatz. So wurde jedes Material in insgesamt 4 Tieren getestet. Am Tag 25 nach der OP bekam jede Ratte den Fluoreszenzmarker, Calcein grün, s.c. injiziert und nach 28 Tagen post operationem erfolgte die Euthanasie der Tiere.

Tab. 3.1 Implatationsschema

Rattennummer	Art des Implantats	Sitz des Implantats links	Sitz des Implantats rechts
1	beta Gran	s.c.	i.m.
	<i>Artoss</i>	i.m.	s.c.
	Nexus	s.c.	i.m.
2	Nexus	s.c.	i.m.
	beta Gran	i.m.	s.c.
	<i>Artoss</i>	s.c.	i.m.
3	<i>Artoss</i>	s.c.	i.m.
	Nexus	i.m.	s.c.
	beta Gran	s.c.	i.m.
4	Nexus	s.c.	i.m.
	Nexus	i.m.	s.c.
	Nexus	s.c.	i.m.
5	<i>Artoss</i>	s.c.	i.m.
	<i>Artoss</i>	i.m.	s.c.
	<i>Artoss</i>	s.c.	i.m.
6	beta Gran	s.c.	i.m.
	beta Gran	i.m.	s.c.
	beta Gran	s.c.	i.m.

3.2 Eingesetzte Implantate

3.2.1 NanoBone®

NanoBone® (Artoss GmbH, Rostock, Deutschland) ist ein synthetisches Granulat (Abb. 2), in dem ungesinteres, nanokristallines Hydroxylapatit (HA) in eine SiO₂-Struktur eingebettet ist, die porös bis in den Nanometerbereich ist. Dadurch kommt es zur Kombination einer Nano- mit einer Mikrostruktur und daraus folgend zu einer enormen Porosität, ergo Oberflächenvergrößerung. Die Porosität des Materials liegt bei 60%. Die Zusammensetzung entspricht 76% HA und 24% SiO₂ auf das Gewicht bezogen.

3.2.2 Nexus IC®

Das Nexusimplantat (lifeTEK OrthoBiologics, Gainesville, Florida, USA) ist eine kittartige Komposition (Abb. 3) aus demineralisierter Knochenmatrix (DBM) und Spongiosa in einem Reverse Phase Medium, die osteoinduktiv ist und somit als Positivkontrolle der Studie fungiert. Der totale Knochengehalt beträgt 32% nach Gewicht und die Spongiosastücke haben eine Größe von 850 bis 4000 μ m.

3.2.3 betaGran®

betaGran® (Orthos` Orthobiologics, Bristol, England) ist ebenfalls ein Granulat (Abb. 4) aus β -Trikalziumphosphat (β -TCP) [Ca₃(PO₄)₂] und in seiner Funktion als negative Kontrolle gedacht. Das TCP enthält 39% Calcium und 20% Phosphat nach Gewicht.

3.3 Vorbereitung

Die 6 weiblichen Ratten gehörten der Linie Hsd:RH- Foxn1 rnu an und entstammten einer anerkannten Versuchstierzucht. Sie waren zwischen 12 und 13 Wochen alt und wogen durchschnittlich 0,245 kg wobei das Gewicht zwischen 0,225 und 0,254 kg variierte. Die Ratten wurden zu zweit in Standardkäfigen des Typs III 2 Wochen vor der Operation eingestallt, um sich einzugewöhnen. Sie erhielten Standardfutter für Nagetiere und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

3.4 Operation

3.4.1 Operationsvorbereitung

Die Ratten erhielten eine präoperative Antibiose in Form von Enrofloxacin s.c. (7,5 mg/kg; Baytril® 2,5%, Provect AG, Lyssach, Schweiz) und wurden zur Narkoseeinleitung in eine Anästhesiekammer überführt, in die Isofluran eingeleitet

wurde. Nach Erreichen einer ersten oberflächlichen Betäubung und Entnahme der Ratten aus der Box wurden sie mit Ketamin s.c. (30 mg/kg KG; Ketazol 100®; Dr E Graeub AG, Bern, Schweiz) prämediziert. Die Rücken der Tiere wurden geschoren und mit Kodan® (Tinktur forte Schülke & Mayr, Zürich, Schweiz) desinfiziert. Des Weiteren wurde jedes Tier individuell mit einem Transponder (RIN®, DATAMARS SA, RF-Identification Technology, Bedano-Luugano, Schweiz) und Ringen am Schwanz zur eindeutigen Identifizierung markiert.

3.4.2 Anästhesie

Die Aufrechterhaltung der Anästhesie erfolgte mittels Inhalationsnarkose über eine Maske mit einem Isofluran/Sauerstoffgemisch (2,5% Isofluran, 300-400 ml/min O₂), nachdem die Tiere auf dem Operationstisch in Brust-Bauchlage verbracht wurden. Zum Schutz der Cornea vor Austrocknung erhielten die Ratten eine epithelschützende Augensalbe (Vitamin A Dispersa®; Novartis AG, Basel, Schweiz). Während des gesamten Eingriffes lagen die Tiere auf Wärmekissen um ein Auskühlen zu vermeiden.

3.5 Chirurgischer Eingriff

Die Implantate wurden vorbereitet, indem das Material von Nexus mit Hilfe des beiliegenden Spatels in 12 Teile geteilt (Abb. 3) und die Granula von betaGran® und NanoBone® in die Gefäßdeckel gegeben wurde.

Die OP-Methode der Wahl war das heterotope Implantationsmodell mit Subcutan- und Muskeltaschen, da dies ein anerkanntes Modell für den Nachweis von Osteoinduktivität ist. Nach standardgemäßer aseptischer Vorbereitung und Abdeckung des Operationsfeldes mit sterilen Tüchern wurde eine knapp hinter dem Schulterblatt beginnende, in der Medianen von cranial nach caudal geführte Hautinzision mit einem Skalpell geführt und unter Verwendung einer Schere auf ca. 10 cm verlängert. Hiernach wurde je nach Implantationslokalisation eine subcutane Tasche unter zur Hilfenahme einer Schere stumpf oder im Falle der Muskeltasche mittels Skalpell unter Durchtrennung der Muskelfaszie parallel zum Faserverlauf des M. longissimus dorsi präpariert. Die Einbringung der Implantate in die entstandenen Taschen erfolgte mit einer anatomischen Pinzette. Nach Platzierung der einzelnen Implantate wurde der Verschluss mit einer Tabaksbeutelnaht erreicht. Als Nahtmaterial diente resorbierbarer Faden (Vicryl® 4/0; Johnson & Johnson Intl., Brüssel, Belgien). Die Haut wurde mit einem Skin-Stapler verschlossen und zur Wundabdeckung wurde Op-Site Pflasterspray (Smith & Nephew, London, England) genutzt.

3.6 Postoperatives Management

Nach Abnahme der Maske und Unterbringung der Ratten in so genannte Recoveryboxen, die auf Wärmekissen platziert waren, wurde mit beginnender Bewegung das Analgetikum Buprenorphin s.c. (0,05 mg/kg KG; Temgesic®; Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) zur Schmerzprävention appliziert. Mit Normalisierung der Bewegung wurden die Tiere wie zuvor in Käfige des Typ III verbracht und hatten danach ad libitum Zugang zu Futter und Wasser.

Bis 48 Stunden post operationem erhielten sie alle 8- 12 Stunden Buprenorphin injiziert und am 2. Tag über das Trinkwasser (0,05 mg/kg KG) zum Ausschleichen des Medikamentes, bis keine Schmerzmedikation mehr von Nöten war.

Die postoperative Kontrolle der Tiere verlief wie folgt: in der ersten Woche zweimal und in den anschließenden Wochen einmal täglich, wobei ein besonderes Augenmerk auf die Überprüfung der Wundheilung und des Allgemeinbefindens gelegt wurde. Zusätzlich wurde ein wöchentliches Gewichtsmonitoring durchgeführt. Am 10. Tag post operationem erfolgte die Entfernung der Klammern. Bis zur Euthanasie verblieben die Ratten zu zweit in strukturierten Käfigen des Typ III. 3 Tage vor der Euthanasie bekamen die Ratten Calcein grün s.c. (1ml/kg Fluka AG, Buchs, Schweiz) injiziert.

3.7 Probengewinnung und –aufbereitung

3.7.1 Gewinnung und Aufbereitung der Proben

Die Ratten wurden nach dem bestimmten Intervall von 1 Monat in einer CO₂- Kammer durch Asphyxie euthanasiert. Hiernach erfolgte die Explantation, in dem die Haut des Rückens in der Medianen durchtrennt, die Implantate lokalisiert und aus dem Gewebe herauspräpariert wurden.

Die gewonnenen Proben wurden zur Konservierung in beschrifteten Gläsern für mindestens 7 Tage in 40%igen Alkohol eingelegt und es wurden Makroradiographien der Implantate in einem Faxitron (35kV, 11s, Cabinet x-ray-faxitron systems, model 43855A; Hewlett Packard®, Mc Minnville, Division, Oregon, USA) angefertigt. Hiernach erfolgte die routinemäßige histologisch-aufbereitende Prozedur der Proben. Dementsprechend durchliefen sie zwecks Dehydrierung eine aufsteigende Alkoholreihe (50-100%). Anschließend wurden sie einer 4 Tage währenden Entfettung mit Xylol unter Vakuum unterzogen, wobei das Xylol zweimal ausgewechselt wurde. Danach erfolgte die Infiltration der Proben mit flüssigem Methylmethacrylat (MMA), das aus Methacrylsäuremethylester (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz), Dibutylphthalat

(Merck-Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland) und Perkadox 16 (Dr. Grogg Chemie AG, Stetten, Schweiz) im Verhältnis 89,5 : 10 : 0,5 angemischt und 15 min mit einem Magnetrührer homogenisiert wurde, über 14 Tage in einem luft-evakuierten Behälter in einem Kühlschrank bei 4° C. Nach Umbettung der Proben in luftdichte Teflonformen (massgefertigt von D. Nadler, Jossi AG, Islikon, Schweiz) und Zugabe von frischem Methylmetacrylat wurden sie 14 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt, um die Proben zu schnittfertigen Blöcken polymerisieren zu lassen. Dabei wurde versucht die Proben so auszurichten, dass die Implantate senkrecht zur Schnittachse standen. Anschliessend kamen die Proben für ein bis zwei Tage bei 37,5 °C in einen Wärmeschränk. Nach erfolgter Aushärtung, Bekleben (Technovit® 3040, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland) mit Plastikrahmen und Beschriftung der Blöcke mit der projektbezogenen Tiernummer und einer Histologienummer waren diese bereit zum Sägen. Mittels einer Sägevorrichtung (Präzisionsinnenlochsäge Leica® SP1600; Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden aus den Blöcken je 2 400 µm starke Dickschnitte und zwei 280 µm dicke Fluoreszenzschnitte angefertigt. Die Schnittebenen wurden so gewählt, dass auf den Dick- ein Fluoreszenzschnitt folgte und dazwischen eine Kappe abgesägt wurde. Die angefertigten Schnitte wurden mit 70%igem Alkohol gewaschen, in Zellstofftücher gewickelt und zwischen zwei Metallplatten gelegt, so dass sie über Nacht nachtrocknen konnten und geglättet wurden. Nachfolgend wurden die Dickschnitte im Faxitron (27kV, 11s) mit einem hochauflösenden Film (Fuji Photo Film Co., Ltd. Tokyo, Japan) als Mikroradiographien aufgenommen. Die erhaltenen Probenschnitte wurden entfettet und auf mit Alkohol vorbereitete rechteckige Akropalobjektträger (Perspex GS Acrylicglas Opal 1013; Wachendorf AG Technische Industrieprodukte, Basel, Schweiz) geklebt (Cementit® CA 12; Merz+Benteli AG, Niederwangen, Schweiz) und mit Hilfe einer Schleif- und Poliermaschine (EXAKT Micro-Schleifsystem 400CS; EXAKT Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) auf eine Stärke von 40 µm herunter geschliffen. Die so erhaltenen Dickschnitte wurden einer Oberflächenanfärbung mit Toluidinblau unterzogen.

Um Dünnschnitte von 5-8 µm Dicke für die histologische Auswertung anzufertigen, wurden die Blöcke mit einem Hartschnittmikrotom (Leica® RM 2155; Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) geschnitten, auf Glasobjektträger (Haslab AG, Ostermundigen, Schweiz) aufgezogen, mit Kisolfolie (Haska AG, Bern, Schweiz) abgedeckt und im Wärmeschränk bei 42° C für 2 Tage getrocknet. Hiernach wurden die

Schnitte mit Methoxyethyl-acetat entplastifiziert und ebenfalls mit Toluidinblau, mit der Van Kossa Färbung und McNeals Tetrachrom Gegenfärbung beziehungsweise mit Masson Goldner angefärbt. Des Weiteren wurden die angefertigten Fluoreszenzschnitte als Nativpräparate ebenfalls auf Glasobjektträger geklebt.

3.7.2 Aufbereitung der Leerproben

Um eine Eigenfluoreszenz der Kalziumphosphat Knochenersatzstoffe auszuschliessen, wurden sowohl das β -TCP betaGran[®] als auch das HA-SiO₂ Granulat NanoBone[®] wie oben beschrieben in MMA eingebettet und aus den Blöcken je 2 Dickschnitte angefertigt, von denen jeweils einer nativ belassen wurde. Die verbleibenden Schnitte wurden mit Toluidinblau angefärbt, um die Struktur des nicht eingesetzten Granulates zum Vergleich zu besitzen.

Des Weiteren wurden die Granulate allein für 15 Minuten mit jeweils 5 ml Calcein grün inkubiert, da auch eine mögliche Adsorption des Fluoreszenzfarbstoffes durch die Granulate in Betracht gezogen werden musste. Sie kamen in 40 %igen Alkohol und es wurde eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt. Hiernach erfolgte das oben beschriebene Einbettungsprozedere und nach erfolgter Aushärtung das Sägen der Fluoreszenzschnitte.

3.8 Untersuchungsmethoden und Probenauswertung

3.8.1 Untersuchungsmethoden

Die Dickschnitte wurden als Übersichtsaufnahmen und unter zur Hilfenahme eines Makroskops (Leica M420[®]; Leica Microsystems, Glattbrugg, Schweiz) bei Vergrößerung über eine Digitalkamera (Leica DFC 320[®]) und einer speziellen Software (Leica IM 1000[®]) in einen Computer eingelesen. Ausserdem wurden unter dem Mikroskop (Leica DMR[®]) Detailaufnahmen der Proben erstellt. Für die histologische Untersuchung wurden die Dünnschnitte lichtmikroskopisch bei verschiedenen Vergrößerungen unter dem Mikroskop angeschaut und mit dem oben erwähnten System eingezogen. Die 50 μ m Nativschnitte dienten der Ansicht unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DM6000 B, Lichtquelle Leica CTR6000, Filter L5 für Calcein grün), um die eingelagerten Kalziummoleküle der aktiv in der Mineralisation befindlichen Knochenoberfläche durch intensiv grüne Fluoreszenz sichtbar zu machen. Auch diese Schnitte wurden über eine Digitalkamera (Leica DFC 350 FX) mittels einer Software

(LAS AF Leica Application Suite Advanced Fluorescence 1.6.3. build 1163) eingelesen.

3.8.2 Probenauswertung

3.8.2.1 Qualitative Betrachtung der Implantate und ihrer Umgebung

Die Implantate wurden makroskopisch auf ihren Zustand hin untersucht und ihre Implantationsgebiete auf etwaige Entzündungen, Infektionen oder Gewebenekrosen evaluiert.

3.8.2.2 Qualitative Auswertung der Dickschnitte

Bei der Betrachtung der Detail- und Übersichtsaufnahmen der Dickschnitte wurde besonders geachtet auf:

- Sichtbarkeit/Vorhandensein der Materialprobe
- anteilige Gewebearten soweit differenzierbar
- Besiedelung des Materials
- Bildung einer Kapsel
- Entzündungsanzeichen in der Implantatumgebung

3.8.2.3 Semiquantitative Auswertung der Dünnschnitte

An dem explantierten und histologisch aufgearbeiteten Material wurde die Infiltrationsmenge sowie die Apposition einer Matrix an der Oberfläche des Implantats erfasst und nach folgendem Bewertungsschema eingeteilt:

Tab. 3.2

0	0% Infiltration in beziehungsweise auf dem Implantat
1	1-25% Infiltration in beziehungsweise auf dem Implantat
2	26-50% Infiltration in beziehungsweise auf dem Implantat
3	> 50% Infiltration in beziehungsweise auf dem Implantat

Des Weiteren wurde ein Score für die Materialbesiedlung, die Kalzifikation der Matrixablagerung, das Vorhandensein von Osteoid, enchondraler Ossifikation und einer bindegewebigen Kapsel entwickelt:

Tab. 3.3

0	nein
1	ja

Außerdem erfolgte eine Zellbeurteilung nach den Kriterien, welche Zellen allgemein und ob im speziellen Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen, Lymphozyten und Plasmazellen auftraten und es wurde folgendes Scoresystem für die Parameter erstellt:

Tab. 3.4

0	0 keine der oben aufgeführten Zellen vorhanden
1	1-2 der jeweiligen oben aufgeführten Zelle vorhanden
2	3-5 der jeweiligen oben aufgeführten Zelle vorhanden
3	> 5 der jeweiligen oben aufgeführten Zelle vorhanden

Das umliegende Gewebe, sprich die Muskulatur beziehungsweise das Bindegewebe wurde auf ihre Reaktionen hin analysiert.

3.8.2.4 Auswertung der Fluoreszenzschnitte

Die erstellten 50 μ m-Schnitte wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und auf das Vorhandensein stark fluoreszierender Areale und ihre Lokalisation in Bezug auf das Implantat hin detektiert und somit auf neu eingelagertes Kalzium beziehungsweise die aktiv in der Mineralisation befindliche Knochenoberfläche hin untersucht. Die Kalziummoleküle emittieren durch die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein grün eine intensive grüne Farbe bei der Beleuchtung mit blauem Licht (480/40

nm). Da keinerlei Gesetzmässigkeit im Verhältnis der Lokalisation der fluoreszierenden Aktivität in Bezug zum Implantat festgestellt werden konnte, wurde nur eine deskriptiv-qualitative Beschreibung der Schnitte vorgenommen.

3.8.3 Statistik

Zur statistischen Analyse wurde ein Computerprogramm (SPSS® Base für MAC OS X, Version 16.0, Chicago, Illinois) herangezogen. Bei den mittels eines Scoresystems erhaltenen semiquantitativen Daten wurde unter zur Hilfenahme der faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) die Daten der deskriptiven Statistik wie der Median und die Standardabweichungen von diesem ermittelt. Des Weiteren wurde der Post Hoc Test nach Scheffe und Bonferroni verwendet, um individuelle Unterschiede zwischen den Gruppen zu dokumentieren. Zur endgültigen Auswertung der Signifikanzen wurde nur der Test nach Scheffe genutzt, da sich beim Vergleich der Daten keine gravierenden Unterschiede zwischen den beiden Tests zeigten. P-Werte, die $< 0,05$ waren, wurden als statistisch signifikant erachtet. Die Korrelationen der einzelnen Parameter wurden mit der Auswertung nach Pearson ermittelt.

4 Resultate

4.1 Operation

Die Operation verlief ohne Komplikationen und konnte an allen 6 Ratten wie geplant durchgeführt werden. Die Einbringung von NanoBone® und betaGran® in die Subcutan- bzw. Muskeltaschen war aufgrund der kleinen einzelnen Granula etwas zeitaufwendig. Die modellierbare Substanz Nexus IC® konnte mit dem beiliegenden Spatel in etwa gleichgroße und den Taschen angepasste Portionen geteilt und implantiert werden.

4.2 Postoperative Phase

In der postoperativen Phase ergaben sich keinerlei Auffälligkeiten und die Tiere erholten sich komplikationslos von der Anästhesie. Die Gesundheitsüberwachung erfolgte anhand der Parameter Allgemeinbefinden, Funktion der Gliedmassen, Kontrolle der Wunde und wöchentlicher Körpergewichtskontrolle und wurde nach einem festgelegten Scoresystem bewertet. Am Tag der Operation war bei einigen Tieren das Allgemeinbefinden vermindert wobei sich das Verhalten im Laufe des folgenden Tages normalisierte. Bei Ratte 1 konnte fünf Tage nach der Operation eine leichte Verkrustung der Wunde mit leichter Spaltbildung und bei Ratte 4 die Verkrustung einer Injektionsstelle verzeichnet werden, die ohne weitere Probleme abheilten. Zu keinem Zeitpunkt trat bei einem der Tiere eine funktionelle Störung der Gliedmassen auf, konnte eine Wundkomplikation verzeichnet werden oder trat ein erheblicher Gewichtsverlust auf. Bei allen Ratten konnte eine per primam Heilung der Haut erzielt werden. Auch die subkutanen Injektionen des Calcein grün 3 Tage vor der Euthanasie verursachten keine Reaktion.

4.3 Makroskopische Auswertung

4.3.1 Subkutantaschen

Alle Subkutantaschen unabhängig von der Lokalisation und der Implantattypen waren makroskopisch unauffällig, das heißt es konnten keinerlei Entzündungsanzeichen, Infektionen oder Gewebenekrosen evaluiert werden und die Implantate lagen reaktionslos im umgebenden Gewebe eingebettet und bildeten mit diesem einen Verbund. Alle Materialproben konnten wieder gefunden und das umliegende Gewebe entfernt werden.

4.3.2 Muskeltaschen

Alle in der Muskulatur lokalisierten Implantate fielen durch Reaktionslosigkeit des sie umgebenden Gewebes auf. Die Muskulatur zeigte sich in Form, Farbe und Struktur physiologisch. Die Materialien hatten eine starre Masse geformt, die fest an die sie umgebende Muskulatur angeheftet waren und aus der sie herauspräpariert wurden. Es konnten bis auf eine alle Proben wieder gewonnen werden. Hierbei handelte es sich um eine intramuskulär implantierte Probe des β -TCPs, die nicht mehr auffindbar war und eine Verhärtung der Muskulatur eventuell fälschlicherweise als Probe angesehen wurde.

4.4 Mikroradiographien

In den mikroradiographischen Aufnahmen der Dickschnitte stellte sich das DBM-Produkt Nexus IC[®] als relativ homogene röntgendurchlässige Masse mit vereinzelt röntgendichteren über den gesamten Querschnitt des Materials verteilten Bezirken da. Bei dem Hydroxylapatit NanoBone[®] und dem β -TCP-Knochenersatzstoff waren als röntgenologisch dichte Strukturen noch die ursprüngliche Granulatform erkennbar. Anhand der Bilder war auszumachen, dass eine Muskelprobe des Nexus IC[®] kein Material enthielt und in einem Schnitt keines mehr in der Schnittebene war. Bei den Schnitten von NanoBone[®] und betaGran[®] war bei ersterem in zwei Schnitten unterschiedlicher Proben kein Material anzutreffen und bei letzterem in einem der zwei Schnitte einer Probe keines zu erkennen.

4.5 Dickschnitte

Die Betrachtung der Dickschnitte unter dem Makroskop beziehungsweise unter dem Mikroskop in der fünfer Vergrößerung ergab für die Muskel- und Subkutantaschen ein ähnliches Bild. In einem Schnitt einer betaGran[®]-, in zwei Schnitten von zwei NanoBone[®]- und in einem Schnitt einer Nexus IC[®]-Probe beziehungsweise eine gesamte Implantatprobe der letzteren konnte kein Material angesprochen werden. Alle Schnitte zeigten je nach Lokalisation Muskulatur oder Gewebe der Subkutis um das Implantat, Bindegewebe und eine zelluläre Infiltration deren Charakter aber anhand der Dickschnitte nicht auszumachen war (Abb. 5 – 10). Eine Besiedlung der Materialien war zu sehen. Um alle Implantate war die Bildung einer bindegewebigen Kapsel zu verzeichnen. Es konnten keine Entzündungsanzeichen oder Gewebenekrosen in der unmittelbaren Umgebung ausgemacht werden

4.6 Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung der Dünnschnitte erfolgte semiquantitativ in der zehner, zwanziger und vierziger Vergrößerung und je nach Auswertungsparameter in den unterschiedlichen histologischen Färbungen. So wurde für die Zellzählung von Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen, Lymphozyten und Plasmazellen, sowie für die Erkennung enchondraler Ossifikation Toluidinblau gefärbte Schnitte herangezogen. Die Masson-Goldner Färbung (Abb. 11, 13, 15) wurde zur Bestimmung der Apposition, der Osteoidbildung sowie des Vorhandenseins einer bindegewebigen Kapsel verwendet. Die van Kossa/Mc Neal Färbung (Abb. 12, 14, 16) diente bei der Materialbesiedlung, der Infiltrationsmenge und dem Vorhandensein von Kalzifikationen als Auswertungsgrundlage.

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde in drei Gesichtsfeldern entlang des Implantates der jeweilige Zelltyp gezählt, die Ergebnisse zusammenaddiert, der Durchschnitt errechnet und dieser Wert entsprechend seines Scorewertes tabellarisch festgehalten. Die Appositionsmenge und die Infiltrationsmenge wurden prozentual festgelegt und die Parameter Materialbesiedlung, Kalzifikation, Osteoidbildung, enchondrale Ossifikation und bindegewebige Kapsel wurden auf ihr Vorhandensein ausgewertet.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Auswertungsparameter können der Tabelle A.1 im Anhang entnommen werden.

Die Daten der semiquantitativen histologischen Auswertung sind in den Tabellen A.2-4 aufgeführt.

4.6.1 Subcutantaschen

4.6.1.1 Nanocomposite/ NanoBone®

Bei den Dünnschnitten der subkutanen Implantate des Nanocomposites konnten jeweils alle Schnitte verwendet werden. Bei der Durchsicht zeigte sich, dass alle Implantate von einer schmalen bindegewebigen Kapsel umgeben waren, die sich zwischen den Granula fortzog. Eine Materialbesiedlung hatte durchweg stattgefunden. Die Infiltrationsmenge lag zwischen 1-25% bzw 50%, (wobei sowohl Bindegewebe als auch Zellen zu erkennen waren). An der Oberfläche der peripher liegenden Granulate war stellenweise die Apposition einer matrixartigen Schicht auszumachen, die partielle Kalzifikationen aufwies und von der aufgrund ihrer Anfärbbarkeit angenommen werden kann, dass sie wahrscheinlich proteoglycanhaltig ist. Das zelluläre Bild ergab eine mässige Infiltration durch Fremdkörperriesenzellen und Makrophagen sowie ein geringes Vorkommen von

Lymphozyten und Plasmazellen. Bei zwei Proben des Nanocomposites waren zahlreiche und neutrophile Granulozyten um das Implantat herum anzutreffen, die teilweise pyknotische Kerne zeigten und von einer demarkierenden bindegewebigen Kapsel umgeben waren. Eine bakterielle Besiedlung konnte nicht festgestellt werden. Das heisst es lagen alle Anzeichen einer eitrigen Entzündung vor. Stellen mit enchondraler Ossifikation sowie Osteoid konnten nicht beobachtet werden.

4.6.1.2 Demineralisierte Knochenmatrix/ Nexus IC®

Die histologischen Schnitte der demineralisierten Knochenmatrix zeigten ausnahmslos eine Besiedlung des Materials mit einer Infiltrationsrate von 1-50%. Auch hier konnte die Bildung einer schmalen Bindegewebskapsel um das Implantat herum beobachtet werden, die sich in das Innere fortsetzte. Die Oberfläche der Knochenmatrix war teilweise bis zu 75% mit einer Matrixschicht bedeckt, die kalzifiziert war. Des Weiteren konnten um die Knochenmatrixstücke Osteoidablagerungen nachgewiesen werden. In einem der Schnitte war das typische Bild einer enchondralen Ossifikation vorhanden. Die zelluläre Infiltration des Materials und seiner Umgebung unterschied sich nicht signifikant von der des Nanocomposites. Eine mässige Anzahl von Makrophagen, ein geringes Ausmass an Lymphozyten und Fremdkörperriesenzellen sowie ein gelegentliches Auftreten von Plasmazellen war zu verzeichnen.

4.6.1.3 β -Trikalziumphosphat/ betaGran®

Bei der Auswertung der Histologieschnitte der subcutanen β -TCP-Implantate konnten zwei nicht untersucht werden, da in den Schnittebenen kein Knochenersatzstoff vorhanden war. In den vier weiteren Fällen konnte aufgrund der porösen Struktur des Materials bei der Herstellung der Dünnschnitte sich dieses herauslösen und somit die Parameter Materialbesiedlung, Infiltrationsmenge, Apposition, Kalzifizierung und Osteoidbildung nicht ausgewertet werden. Um die β -TCP-Proben hatte sich, wie auch schon bei den anderen Materialien gesehen, eine bindegewebige Kapsel ausgebildet, die sich auch hier wieder zwischen die einzelnen Granulate erstreckt haben musste, da noch Bindegewebsstränge auszumachen waren. In der Umgebung der ehemaligen Implantatlokalisation war eine mittelgradige Infiltration des Gewebes mit Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen manifest. Andere Entzündungszellen wie Lymphozyten und Plasmazellen konnten in geringem Ausmass beobachtet werden, beziehungsweise kamen nur gelegentlich vor.

4.6.2 Muskeltaschen

4.6.2.1 Nanocomposite/ NanoBone®

Bei den Histologien der Nanocomposites war einer nicht auszuwerten, da in den Schnittebenen kein Material angetroffen oder ein ehemaliger Implantationsort gefunden wurde. Bei dreien konnte nur die Kapselbildung und das Zellbild untersucht werden. Dies lag an dem Herausbröckeln des Materials bei der Präparatherstellung. Die bezüglich der Materialbesiedlung zur Betrachtung in Frage kommenden Schnitte zeigten eine Besiedlung mit Zellen und Bindegewebe mit einer Infiltrationsrate bis 25%. Die Apposition der bereits erwähnten matrixartigen Schicht konnte nur an einem Schnitt dargestellt und auch hier die flächenweise Kalzifikation festgestellt werden. Das Vorhandensein von Osteoid und enchondralen Ossifikationsherden war an einem, beziehungsweise zwei Dünnschnitten beurteilbar, konnte dort jedoch nicht nachgewiesen werden. Alle Proben waren von einer Bindegewebskapsel umsäumt, deren Ausläufer zwischen die Granulate einwuchs (Abb. 11, 12). Das zelluläre Bild wurde von Makrophagen dominiert, die in einem mittleren bis hochgradigen Ausmass vorhanden waren. Fremdkörperriesenzellen waren in mässiger Anzahl zu beobachten. Lymphozyten und Plasmazellen hingegen konnten nur gelegentlich festgestellt werden.

4.6.2.2 Demineralisierte Knochenmatrix/ Nexus IC®

Das Betrachten des DBM-Materials ergab einen nicht verwendbaren Schnitt, da in der Ebene kein Material anzutreffen war. Bei einem weiteren Schnitt konnte die Materialbesiedlung und Infiltrationsrate nicht zur Auswertung herangezogen werden, weil das Material sich aus dem Schnitt gelöst hatte. Bei den restlichen war an den Oberflächen des Materials die Apposition einer Matrix zu vermerken, die teils bis zu 75% der dekalzifizierten Knochenmatrices bedeckte und in der eine voranschreitende Kalzifizierung der Schicht nachzuweisen war. In allen Dünnschnitten konnte die Ablagerung von Osteoid in direktem Kontakt mit und in der unmittelbaren Nähe von den Knochenmatrix- und Spongiosastücken dargestellt werden. In Schnitten von zwei Proben waren Herde von enchondralen Ossifikationen vorhanden. Die Implantate waren allesamt von einer feinen Bindegewebskapsel umhüllt, deren Ausläufer in das Material eindringen (Abb. 13, 14). Als prominentester Zelltyp konnten Makrophagen angesprochen werden, die in mässiger Anzahl anzutreffen waren. Fremdkörperriesenzellen und Lymphozyten konnten in geringem Ausmass beobachtet und Plasmazellen nur sehr vereinzelt gefunden werden.

4.6.2.3 β -Trikalziumphosphat/ betaGran®

Bei der mikroskopischen Durchsicht der Dünnschnitte der intramuskulären Implantationen waren beim β -TCP-Material bei drei der Schnitte nur die Kapselbildung und die Zellen interpretierbar und zwei waren gar nicht auswertbar, da entweder das Material sich aus dem Schnitt herausgelöst hatte oder kein Material in der Schnittebene vorhanden war, beziehungsweise das Implantat bei der Explantation nicht wieder gefunden wurde. Bei dem verbliebenen Schnitt konnte weder eine Besiedlung des Materials festgestellt noch eine Apposition einer matrixähnlichen Schicht angesprochen werden. Kalzifikationen waren nicht nachweisbar und das Vorhandensein von Osteoid oder enchondralen Ossifikationsherden musste verneint werden. Eine bindegewebige Kapsel konnte in vier Schnitten dargestellt werden (Abb. 15, 16). Das Infiltrationsausmass von Fremdkörperriesenzellen und Makrophagen war mit geringem Vorkommen zu bewerten. Lymphozyten traten nur wenige auf und Plasmazellen waren nur sporadisch zu sehen.

4.6.3 Statistischer Vergleich der Implantate

Aufgrund der wenigen Auswertungsdaten der betaGran® Proben bei den Parametern Materialkolonisation, Menge der Apposition und Infiltration und Vorhandensein von Kalzifikationen, Osteoid und enchondralen Ossifikationen wurden in diesen Bereichen nur NanoBone® und Nexus IC® miteinander verglichen. Bei beiden Materialien zeigte sich ein ähnliches Einwachsverhalten. Eine signifikant höhere Appositionsmenge ($p=0,031$) des Nexus IC® gegenüber dem NanoBone® konnte festgestellt werden. Des Weiteren konnte ein signifikant vermehrtes Vorkommen von Kalzifikationen ($p=0,026$) bei Nexus IC® ermittelt werden. Enchondrale Ossifikationen wurden nur bei vereinzelten Nexus IC® Proben gefunden, allerdings ergab sich keine Signifikanz. Bei der vergleichenden Untersuchung der beiden Materialien auf Osteoidablagerungen konnten diese nur bei Proben der demineralisierten Knochenmatrix beobachtet werden. Bei der statistischen Untersuchung der verschiedenen Zelltypen konnten die Scorewerte für das betaGran® mit einbezogen werden. Das Vorkommen von Fremdkörperriesenzellen, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen bei den drei verschiedenen Implantattypen unterschied sich nicht signifikant.

Bei der Auswertung der Korrelationen stellte sich heraus, dass die Infiltrationsmenge sowohl positiv mit der Materialbesiedlung ($r=0,559$, $p=0,013$) als auch mit der Appositionsrate ($r=0,613$, $p=0,007$) korrelierte. Des Weiteren war eine positive

Korrelation zwischen der Apposition und dem Vorkommen von Osteoid ($r=0,558$, $p=0,013$) sowie von enchondralen Ossifikationsherden ($r=0,775$, $p=0,000$) zu verzeichnen. Für die Zellpopulation ergab sich ein positives Korrelieren der Präsenz von Makrophagen mit Fremdkörperriesenzellen ($r=0,478$, $p=0,006$), Lymphozyten ($r=0,397$, $p=0,027$) und Plasmazellen ($r=0,428$, $p=0,16$), wobei für die Korrelationen der Parameter Infiltrationsmenge/ Apposition, Apposition/ enchondrale Ossifikation und Makrophagen/ Fremdkörperriesenzellen ein p-Wert $< 0,01$ als signifikant angesehen wurde, während für die anderen ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant galt.

Tab. 4.1 Korrelationen

Variable	Correlation Coefficient	p-Wert
amount of infiltration/ material colonisation	0,599	0,013
amount of infiltration/ Apposition	0.613	0,007
apposition/ Osteoid	0.558	0,013
apposition/ enchondrale ossification	0,775	0,000
macrophages/ foreign body cells	0,478	0,006
macrophages/ Lymphocytes	0,397	0,027
macrophages/ plasma cells	0,428	0,016

4.7 Fluoreszenzschnitte

4.7.1 Subcutantaschen

Bei der Durchsicht der Fluoreszenzschnitte fiel auf, dass die NanoBone[®] Granulate eine mittel- bis hochgradige Fluoreszenz zeigten, die vor allem entlang der Oberfläche, aber auch in das Innere reichend prominent war. Die β -TCP Granula des betaGran[®] liessen sehr vereinzelt geringgradig fluoreszierende Areale, die nur die Oberfläche betrafen, erkennen. Bei der demineralisierten Knochenmatrix Nexus IC[®] waren sehr wenige dafür aber intensiv leuchtende punktuelle Oberflächenbezirke darstellbar.

4.7.2 Muskeltaschen

Tendenziell fluoreszierten die intramuskulär implantierten Präparatproben vermehrt. Die Intensität der NanoBone[®] Proben konnte als mittel- bis hochgradig eingeschätzt werden und war auch hier im Vergleich am flächigsten über die Gesamtheit der Granula verteilt. Bei den betaGran[®] Implantaten waren wiederum nur einige wenige geringgradige Fluoreszenzen der Oberfläche anzusprechen. Die Nexus IC[®] Schnitte liessen erneuert eine bezirksweise auftretende intensive Fluoreszenz der Knochenmatrixfragmente erkennen (Abb. 17 - 19).

4.7.3 Leerproben

Die Leerprobe der nicht mit Calcein grün inkubierten Granula von NanoBone[®] liess keine Anzeichen einer Eigenfluoreszenz der Hydroxylapatit-Silizium Komposition (NanoBone[®]) erkennen. Nach der Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff und der histologischen Aufbereitung zeigte das Material eine leichte fluoreszierende Aktivität einzelner Granula. Die Betrachtung der betaGran[®]-Granulate unter dem Fluoreszenzmikroskop ergab ebenfalls keine selbstständige Fluoreszenztendenz des β -TCP-Materials und nach vorausgegangener Inkubierung war eine geringgradige Fluoreszenz nachzuweisen.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte die Bestätigung der osteoinduktiven Eigenschaft eines schon auf dem Markt befindlichen Knochenersatzmaterials bestehend aus einer Mischung von Hydroxylapatit (HA) und Siliziumdioxid (SiO_2) (NanoBone®) sein, dass im heterotopen Implantationsmodell in der Muskulatur und der Subkutis von Ratten untersucht und gegen eine Positiv- sowie Negativkontrolle verglichen wurde. Die beiden Kontrollgruppen lieferten die zu erwartenden Ergebnisse. Die DBM der Positivkontrolle zeigte in den histologischen Schnitten eine zelluläre Infiltration, die Apposition einer Matrix an der Oberfläche der Knochenmatrixfragmente und deren beginnende Kalzifizierung. Des Weiteren konnte Osteoidbildung beobachtet werden und in einzelnen Schnitten waren enchondrale Ossifikationsherde mit blasigen Knorpelzellen darstellbar. Somit erwies sich die DBM, wie in vielen vorangegangenen Studien beobachtet, als osteoinduktiv^{7,302-305}. Bei dem als Negativkontrolle fungierenden β -Trikalziumphosphat (β -TCP) gab es aufgrund seiner porösen Struktur Probleme bei der Erstellung der Dünnschnitte, so dass nicht alle Parameter bei der Auswertung berücksichtigt werden konnten, beziehungsweise die erhaltenen Parameter durch die geringe Probenanzahl als nicht aussagekräftig gelten können. Nichtsdesto trotz konnten so weit feststellbar keine Anzeichen einer Knochenneubildung nachgewiesen werden.

Das zu testende Präparat ist ein synthetisches Nanocomposite, dessen Basis aus einer Siliziumdioxid-Struktur in Verbund mit nanokristallinem HA besteht und in einem Sol-Gel Verfahren hergestellt wird. Die Kristallite weisen eine Porosität von 60% auf, sind interkonnektiv und ihre Grösse liegt im Nanobereich, so dass im Vergleich zu ihrem Volumen ein beachtliches Oberflächenareal entsteht, auf dem sich nach Implantation sofort endogene Proteine anlagern können. Die Siliziumdioxidmoleküle sollen die Knochen- und Kollagenbildung stimulieren und kommen in Betracht den zusätzlichen Effekt zu erfüllen, Proteine an der Oberfläche zu fixieren. Bei Einsatz des Materials in den Knochen zeigte sich nicht nur ein langsamer Abbau durch Osteoklasten mit gleichzeitigem Ersatz durch neuen Knochen und Osteokonduktivität, sondern auch osteoinduktive Eigenschaften³⁰⁶. Nach der heterotopen Implantation konnte sowohl die Materialinfiltration als auch die Apposition einer proteoglycanhaltigen Matrix auf die Oberfläche der Granula und deren Kalzifizierung beobachtet werden. Allerdings waren

weder herkömmliches Osteoid noch Gebiete mit enchondrale Ossifikationen nachweisbar.

Das in dieser Arbeit verwendete Versuchsmodell ist eine etablierte Methode zur Evaluierung eines Materials auf seine osteoinduktive Eigenschaft hin^{7,101,107}. Neben der Wahl des Modells spielen Kriterien wie die Spezies, das Alter der Tiere, die Implantatgrösse und Beschaffenheit sowie dessen Lokalisation und der Implantationszeitraum eine Rolle.

Die heterotope Implantation eines induktiven Agens und die daraus resultierende ektopische Knochenformation wurde seit Anfang des letzten Jahrhunderts zum Studium des Osteoinduktionsphänomens genutzt^{7,20,21,32-34,36,42,64,84,307} und aufgrund dieser Forschungsarbeiten verschiedenste Substrate wie Knochentransplantate, demineralisierte Knochenmatrix, deren Extrakte sowie einzelne Wachstums- und Differenzierungsfaktoren inklusive der Bone Morphogenetic Proteins und entdeckt^{7,43,49,54,57-60,63,65,94}, die in der Lage sind eine Knochenbildung zu induzieren. Da bis heute das autologe Knochentransplantat als Goldstandard^{2,4,12,196,198} für den Ersatz von Knochen in der Knochenchirurgie gilt, es allerdings einige gravierende Nachteile aufweist^{12,205}, wurde und wird nach einem adäquaten synthetischen Knochenersatzstoff gesucht, der neben einer hohen Biokompatibilität, struktureller Integrität, Osteoaffinität und guter Osseointegration osteokonduktive, osteogene und osteoinduktive Eigenschaften besitzen sollte^{1,2,194,215}. Aufgrund dessen werden Knochenersatzstoffe im heterotopen Implantationsmodell getestet, wobei die intramuskuläre und subkutane Lokalisation bevorzugt werden^{5,135,136}. Der Vorteil ektopischer Implantationen gegenüber der orthotopen Einbringung liegt vor allem im Ausschluss der Beeinflussung des Ergebnisses durch das Knochengewebe. Insbesondere einer Verfälschung durch die Wirkung von osteogenetischen Zellen, BMPs^{89,94,107} und lokal frei werdenden Wachstums- und Differenzierungsfaktoren^{5,43,54,55,57,58,60,132} auf die Proliferation und Differenzierung von Zellen und die Angiogenese kann entgegen gewirkt werden. Der Unterschied zwischen subkutaner und intramuskulärer Implantation liegt vor allem in der unterschiedlichen Blutversorgung der Gewebe und somit einem differierenden Sauerstoffangebot bzw. Sauerstoffpartialdruck, der sich sowohl auf die Kollagenformation, die Angiogenese, die osteoblastische und osteoklastische Aktivität als auch die Kallusformation und Mineralisation positiv auswirkt. Des Weiteren dürfte das Angebot an unreifen Mesenchymalzellen am Implantationsort von Bedeutung sein.

Die Frage der geeigneten Tierspezies für die Erbringung aussagekräftiger und nutzbarer Ergebnisse ist diffizil, da der Prozess der Osteoinduktion durch Biomaterialien nicht abschliessend erklärt werden kann⁸⁹ und die verschiedenen bis zu diesem Zeitpunkt gelaufenen Studien durch unterschiedliche Tierspezies und Kalziumphosphatmaterialien schwer miteinander verglichen werden können. Osteoinduktion durch Kalziumphosphate konnte in Kaninchen, Ziegen, Schafen, Schweinen, Hunden und Affen nachgewiesen werden^{13,71,75,78,81,83,86,88,92,108,110-112,114,116,251,308}. Hingegen konnte Knocheninduktion durch synthetische Biomaterialien kaum im Weichteilgewebe von Ratten oder Mäusen erzeugt werden^{81,92}. Um die Abhängigkeit des Induktionsprozesses von der Tierart besser vergleichend beurteilen zu können, wurde verschiedenen Spezies derselbe Knochenersatzstoff implantiert und neben den Feststellungen, dass unterschiedliche Zeitpunkte der Knochenformation auftraten und die Inzidenz an Knochen umso grösser ist, je höher die Tierspezies in der phylogenetischen Entwicklung steht, konnten auch starke individuelle Variationen aufgedeckt werden^{13,71,81,89,92,108,109,111,119}. Für den erheblichen morphologischen Unterschied in der Antwort zwischen Nagern und Primaten wird die Differenz in der Knochenhomöostase verantwortlich gemacht¹¹¹.

Ein weiterer zu berücksichtigender Faktor ist das Alter der Tiere, da juvenile Tiere ein höheres osteogenetisches Potential besitzen, sollten in Studien über den Knochen adulte Tiere verwendet werden, um überdurchschnittliche Ergebnisse zu vermeiden³⁰⁹.

Weitere nicht zu vernachlässigende Kriterien sind die physikochemikalische Beschaffenheit, die Geometrie und die Grösse der Kalziumphosphatimplantate, da diese Charakteristika relevant für die biologische Aktivität und die Eigenschaften der Materialien sind. So scheinen Kalziumphosphattyp, Dissolution, Makro- und Mikroporosität, spezifische Oberfläche, Interkonnektion, Porengrösse und Form und Grösse des Implantates eine entscheidende Rolle beim Zustandekommen des Osteoinduktionsprozesses inne zu haben^{78,83,88,89,97,109-111,119,254,290,310,311}.

Auch die Implantationsdauer ist von Wichtigkeit, da je nach verwendetem Kalziumphosphat, Implantationsort und Tierspezies differierende Zeitpunkte der beginnenden Knochenformation genannt werden. Dieser Zeitraum wird in der Literatur mit 6-12 Wochen nach intramuskulärer Implantation angegeben^{71,75,77,80,83,88,97,111,278,279,291}.

Für diese Studie wurden Ratten gewählt, da in diese Tiere von ihrer Grösse her genügend Implantate eingesetzt werden können, um eine statistisch aussagekräftige

Probenmenge zu testen und trotzdem die Tierzahl so gering wie möglich halten zu können. Mit der heterotopen Implantation von je drei Proben intramuskulär respektive subkutan pro Ratte konnte der Unterschied von verschiedenen Materialien sowohl zwischen den Lokalisationen innerhalb eines Individuums als auch unter den Tieren untersucht und so tierspezifische Schwankungen nivelliert werden. So konnten bis zu drei Implantattypen in zwei Lokalisationen pro Ratte verwendet werden. Des Weiteren sind Ratten einfach in der Handhabung und Unterbringung, können unter definierten Bedingungen gehalten werden und sind kosteneffektiv^{309,312,313}. Ausserdem kommt hinzu, dass die Osteoinduktion aufgrund der Komplexität der verschiedenen ablaufenden Stoffwechselvorgänge nur am lebenden Tier untersucht werden kann und der Mineralmetabolismus der Ratte gut dokumentiert ist³¹².

Die Operationen konnten wie geplant durchgeführt werden und die Kreierung der heterotopen Taschen paramedian der Wirbelsäule verlief problemlos. Die gute Portionierbarkeit und Modellierbarkeit des DBM-Produktes Nexus IC® erwies sich als vorteilhaft bei der Einbringung in die Taschen. Hingegen war die Handhabung der beiden Granulate von NanoBone® und betaGran® bei der Befüllung der Muskel- und Subkutantaschen diffizil und etwas zeitaufwendiger. Allerdings wurde die NanoBone-Granula auch nicht vor der Verwendung mit Eigenblut angemischt, sondern mit Natriumchloridlösung angefeuchtet. Dessen Verwendung soll laut Beipackzettel unterlassen werden, um einer Vermischung des Materials mit dem Patientenblut und somit mit den Wachstums- und Differenzierungsfaktoren nicht im Wege zu stehen. Ein negativer Effekt der Natriumchloridlösung auf eine eventuelle Knochenwachstum fördernde Wirkung kann nicht ausgeschlossen werden, da die Durchtränkung unter Umständen zu einer schlechteren Bereitstellung an endogenen knochenrelevanten Proteinen im/am Implantat und zu einer folgenden Verminderung der Wirkung der Präzipitationsschicht geführt haben könnte.

Wie beschrieben kam es weder in der Aufwachphase noch im postoperativen Zeitraum zu Komplikationen und die subkutane Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes Calcein grün wurde von allen Tieren gut toleriert und blieb klinisch folgenlos.

Bei der drei Tage später folgenden Euthanasie konnten alle Implantate bis auf eine intramuskuläre Probe des betaGran® Knochenersatzstoffes wieder entnommen werden. Makroskopisch waren keinerlei Entzündungsanzeichen, Infektionen oder Gewebnekrosen in der Umgebung der Implantate zu evaluieren. Die Explantation erwies in Hinblick auf die genaue Bestimmung der Lokalisation der Materialien sowie

die feste Verwachsung der Proben mit dem sie umgebenden Gewebe als nicht ganz einfach. Daher musste dann anhand der von den angefertigten Dickschnitten erstellten Mikroradiographien und den Schnitten selbst festgestellt werden, dass nicht in allen Fällen Material in der Schnittebene vorhanden war. Da aufgrund der geringen Grösse der Implantate ein erneutes schneiden jedoch nicht möglich war wurden diese Präparate nicht ausgewertet. Die Dickschnitte färbten sich qualitativ sehr unterschiedlich an, so dass bei ihnen auf eine semiquantitative Beurteilung verzichtet und stattdessen die Ergebnisse deskriptiv dargestellt wurden. Bei der Herstellung der Dünnschnitte trat vor allem bei den Proben mit der β -TCP- Granula betaGran® das Problem zu tage, dass das Material beim Schneiden mit dem Mikrotom eine Tendenz zum Herausbröckeln zeigte. Dies war bei insgesamt acht Schnitten des betaGrans®, vier des Nanobons® und einen des Nexus IC® der Fall. Bei diesen Präparaten wurden nur die Parameter Kapselbildung und Zellvorkommen bewertet. Des Weiteren zeigten ein Präparat von Nexus IC® und drei von betaGran® durch vollständige Abwesenheit von Material, dass es nicht gelungen war die richtige Schnittebene zu treffen beziehungsweise die Implantatgrösse für die Menge an histologischen Schnitten zu gering war und wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Konnten einzelne Parameter nicht in der für sie vorgesehenen Färbung bestimmt werden, wurde versucht sie mittels der anderen Färbungen zu bestimmen.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse der semiquantitativen Daten der Dünnschnitte wurde mittels einer faktoriellen Varianzanalyse durchgeführt (ANOVA), wobei der Vergleich aller drei Gruppen nur für die Variablen Zellvorkommen und Kapselvorhandensein möglich war. Mit dieser Methode ist der Vergleich von Mittelwerten mehrerer Gruppen realisierbar unter der Annahme, dass die Tiere aus einer hinsichtlich der untersuchten Parameter normal verteilten Population stammen. Ausserdem wurden die Variablen nach Pearson auf etwaige Korrelationen hin geprüft. Unter zu Hilfenahme der mittels der Studie erhaltenen Ergebnisse sollte die Frage geklärt werden, ob der getestete Knochenersatzstoff osteoinduktive Eigenschaften besitzt. Zur Überprüfung und zum Vergleich standen eine Positiv- und eine Negativkontrolle zur Verfügung.

Die makroskopische Untersuchung der explantierten Proben lieferte keinen Aufschluss über eine stattgefundene Knochenneubildung. Allerdings konnte eine gute Biokompatibilität aller drei Materialien angenommen werden, da sich keine Anzeichen einer entzündlichen Hyperämie, Nekrosen oder Abkapslungen fanden.

Die Aussagekraft der Mikroradiographien bezüglich neu gebildeten Knochens war aufgrund der nahezu äquivalenten Röntgendichte von Hydroxylapatit, β -Trikalziumphosphat und Knochen eingeschränkt.

Das histologische Bild der demineralisierten Knochenmatrix Nexus IC[®] spiegelte, den typischerweise beschriebenen Prozess der Osteoinduktion mit zellulär- bindegewebiger Infiltration, die Apposition proteoglykanhaltiger Matrixablagerungen an der Oberfläche und in der Peripherie der Knochenmatrix, die beginnende Kalzifizierung dieser Matrixschicht, das Vorhandensein von Osteoid und Areale mit enchondraler Ossifikation wieder^{7,32,36,54,314,315}.

Die Präparate des NanoBone[®] zeigten ebenfalls ein Einwachsen bindegewebiger Strukturen zwischen die Granula und eine Besiedlung mit einem Zellbild, das dem der physiologischen Knochenheilung ähnlich war. Das heisst es konnte eine geringe bis mittlere Anzahl lymphozytärer Zellen, Plasmazellen und Makrophagen angesprochen werden. Komplettiert wurde das Bild durch Zellen des mononukleären Phagozytosesystems, sprich Fremdkörperriesenzellen, die in einem mittelgradigen Ausmass vorhanden waren. Stellenweise war die Apposition einer Matrixschicht auf der Oberfläche der Granula anzusprechen. Deren Erscheinungsbild erweckte den Anschein einer proteoglykanhaltigen amorphen Matrix nicht unähnlich der der extrazellulären Matrix des Knochens. Diese Matrixablagerungen liessen eine beginnende Kalzifizierung erkennen, was bei längerer Implantation zu einer eventuellen Aktivierung von Lining-Cells, Osteoidproduktion und folgender Differenzierung von Osteoblasten und somit zur Knochenbildung hätte führen können. Gerber et al³⁰⁶ konnten zeigen, dass die Siliziumdioxidmatrix des NanoBone[®] innerhalb kürzester Zeit degradiert wird und durch eine unstrukturierte amorphe organische Matrix mit wenigen Kollagenfibrillen ersetzt wird. Weitere Komponenten konnten als Proteoglykane und Glykoproteine identifiziert werden, die in der extrazellulären Matrix des Knochens präsent sind. Ausserdem bewies er die Anwesenheit von Osteocalzin, Osteopontin und BMP-2³⁰⁶, spezifischer Proteine der Knochenmatrix, die als Promoter der Osteogenese gelten³¹⁶⁻³¹⁸. Dieses Geschehen wäre nicht im eigentlichen Sinne des Begriffes Osteoinduktion als diese zu Verstehen, aber als eine Knochendifferenzierung als Resultat der Bildung eines Apatitlayers und der daraus folgende Impuls für die Zellen zur Differenzierung in Richtung der osteogenetischen Zelllinie⁸⁹. Weiter wird vermutet, dass die Präzipitation des Apatitlayers von einer Kopräzipitation durch induktionsrelevante Proteine wie z. B. BMPs begleitet wird^{82,286,319}. Es konnte gezeigt

werden, dass nach orthotoper Implantation von Kalziumphosphatmaterialien diese sich zu lösen beginnen und Kalzium- und Phosphationen abgeben, die nach Sättigung der Mikroumwelt zur Präzipitation der Apatitschicht auf der Oberfläche der Biomaterialien führen und endogene Proteine in diesen Prozess inkludieren^{283,287}. Osteogenetisch kompetente Zellen heften sich an die Schicht an, produzieren die aus Kollagen, Nicht-Kollagenproteinen und Wachstumsfaktoren bestehende extrazelluläre Matrix, die im Folgenden durch Osteoblasten mineralisiert wird und eine Zementlinie formt. Später kommt es zum osteoklasten- mediierten Remodelling⁷⁵. Ein ähnlicher Prozess wird für die ektopische Knocheninduktion angenommen und postuliert, dass die Knochendifferenzierung ein Resultat der Adsorption endogen produzierter BMPs sein könnte mit der Induktion von Knochen als zweite Antwort und dass die Kalziumphosphate als eine Art Matrix für die Adsorption, Speicherung und kontrollierte Freilassung von BMPs fungieren^{111,254}. Damit könnten auch die inter- und intraartlichen Unterschiede erklärt werden, denn neben des unterschiedlichen Ansprechens auf BMPs zwischen phylogenetisch höheren Tieren und Nagern¹⁰⁹ konnte auch von unterschiedlichen Reaktionen auf BMP von Individuen einer Spezies berichtet werden und dies vermutlich auf genetische Faktoren zurückgeführt werden³²⁰. So scheint die Überlegung, dass knochenrelevante endogene Proteine bei der Osteoinduktion durch Biomaterialien eine Rolle spielen⁸⁹ recht plausibel. Durch die oben angeführte synchron ablaufende Kopräzipitation der Proteine mit dem biologischen Apatitlayer auf der Biomaterialoberfläche werden die rekrutierten Zellen zur Differenzierung in Richtung der osteogenetischen Zelllinie animiert. Da die Menge an kopräzipitierten Protein mit der Menge an endogen produzierten Proteinen tierindividuell variiert und die Reaktion des Körpers auf die Proteine Variationen unterliegt, könnte dies eine Erklärung für die beobachteten innerartlichen Unterschiede sein. Die in dieser Studie beschriebene Schicht kann in diesem Sinne interpretiert werden, denn obwohl eine biochemische Untersuchung auf deren Bestandteile unterblieb, kann aufgrund der Anfärbbarkeit und der Färbung sowie der teilweise darstellbaren beginnenden Kalzifikation angenommen werden, dass es sich um eine proteoglycanhaltige Präzipitation handelt, die mit der Ioneneinlagerung beginnt.

Bei zwei in unterschiedlichen Ratten subkutan implantierten Proben des NanoBone[®] konnte im histologischen Präparat eine übermäßige Infiltration von neutrophilen Granulozyten mit ausgeprägtem Vorkommen von Kernpyknosen und der Bildung einer demarkierenden Kapsel zum umliegenden Gewebe der Subkutis nachgewiesen werden.

In diesen Schnitten konnte zusätzlich eine mittel- bis hochgradige zelluläre Infiltration durch Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen und Lymphozyten angesprochen werden. Das zelluläre Bild^{321,322} und die gebildete fibröse Kapsel^{323,324} sind typische Anzeichen eines entzündlichen Geschehens und lassen in diesem Fall eine Fremdkörperreaktion vom Typ der chronisch granulomatösen Entzündung vermuten. Der Grund für diese Entzündung kann entweder die Kontamination durch Luft, nicht sterile chirurgische Techniken oder postoperative Komplikationen wie zum Beispiel eine Wundinfektion sein³²⁵. Da sowohl bei der gleichen als auch bei den anderen Ratten keinerlei Anzeichen einer Entzündung auf diesen Probenotyp zu finden waren und das Material erfolgreich klinisch verwendet wird, ist eine Fremdkörperreaktion auf den Implantattyp unwahrscheinlich und es wird davon ausgegangen, dass eine Kontamination der Proben durch nicht hundertprozentiges steriles Arbeiten durch den Chirurgen erfolgt sein muss. Diese Annahme wird durch die massiv von statten gegangene Invasion neutrophiler Granulozyten unterstützt, da diese zu den typischen phagozytierenden Zellen der immunologischen Abwehr von infektiösen Agenzien gehören³²⁶.

Werden die in dieser Studie erzielten Ergebnisse im Kontext mit den Resultaten in der Literatur zur Knocheninduktion durch Kalziumphosphatbiomaterialien betrachtet, konnte die Bildung einer organisch amorphen Matrixschicht, die im weiteren Verlauf zu kalzifizieren beginnt, nachvollzogen werden^{2,13,71,75,89}. Eine beschriebene anschliessende Knochenbildung konnte nicht angesprochen werden, was zum einen auf die relativ kurze Implantationsdauer zurückzuführen ist, da das Auftreten erster Knochenformation implantationsortbedingt, materialbezogen und speziesabhängig auf einen Zeitraum von sechs bis zwölf Wochen datiert wurde^{92,110,111}. Zum anderen ist ein direkter Vergleich dieser Arbeit mit anderen Publikationen aufgrund des Speziesunterschieds unpassend, da die Literatur beweist, dass der Osteoinduktionsprozess durch Biomaterialien von Interspeziesdifferenzen abhängig ist^{92,109,111}. Weitere Punkte, die einen Vergleich erschweren, sind die Grösse beziehungsweise die Menge des implantierten Knochenersatzstoffes, da auch diese Faktoren einen Einfluss zu scheinen haben^{13,71} und in der vorgenommenen Studie ein relativ kleines Materialvolumen appliziert wurde.

5.1 Schlussfolgerung und Perspektiven

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen das getestete Nanocomposite NanoBone[®] für die kurze Implantationszeit als nicht osteoinduktiv im ursprünglichen

Sinne des Wortes erscheinen. Allerdings kann dem Knochenersatzstoff eine osteoinduktive Aktivität in Richtung der beobachteten und beschriebenen Abläufe des ektopischen Induktionsprozesses durch Biomaterialien nicht abgesprochen werden.

Um eine eindeutigere Aussage treffen zu können, wäre eine histologische Evaluation zu verschiedenen vor allem späteren Implantationszeitpunkten sinnvoll gewesen. Somit hätte man der zeitlichen Abfolge des Osteoinduktionsverlaufs genüge getan und eine differenziertere Sichtweise auf die tatsächlichen osteoinduktiven Eigenschaften des NanoBones[®] erlangt. Grundsätzlich sollte in Hinsicht auf die publizierten Resultate und gerade in Bezug auf die Übertragung der erhaltenen Ergebnisse für den Einsatz beim Menschen in Betracht gezogen werden. Studien über Osteoinduktionscharakteristika von Knochenersatzstoffen in phylogenetisch höher stehenden und von der Knochenphysiologie, dem Knochenaufbau und dem Gewicht dem Menschen ähnlicheren Tieren durchzuführen^{92,111,309}.

Dass Osteoinduktivität von Materialien durch eine schnellere und verbesserte Heilung orthotopischer Defekte eine klinische Relevanz besitzt, konnte bereits mehrfach bewiesen werden^{110,119,120}. Da der Osteoinduktionsprozess bis heute nicht eindeutig erklärbar ist, dessen Kenntnis und das Verständnis der Interaktion zwischen Knochenersatzstoff, BMPs und antwortenden Zellen aber Bedingung sind, werden weiterführende Studien auf diesem Gebiet von Nöten sein, um Knochenersatzmaterialien mit intrinsischen, osteoinduktiven Eigenschaften für den therapeutischen Einsatz zu erhalten und eine Initiation und Forcierung der Osteogenese zu erreichen.

6 Literaturverzeichnis

1. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, et al: Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *J Am Acad Orthop Surg* 3:1-8, 1995
 2. LeGeros RZ: Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res*:81-98, 2002
 3. Sammarco VJ, Chang L: Modern issues in bone graft substitutes and advances in bone tissue technology. *Foot Ankle Clin* 7:19-41, 2002
 4. Damien CJ, Parsons JR: Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 2:187-208, 1991
 5. Soldner E: Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien Grundlagen, aktueller Stand und neue Entwicklungen. *Trauma und Berufskrankh* 3:256-269, 2001
 6. Schürer S, Gopp U, Kühn KD, Breusch SJ: Knochenersatzwerkstoffe. *Der Orthopäde* 32:2-10, 2003
 7. Urist MR: Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-899, 1965
 8. Friedenstein AY: Induction of bone tissue by transitional epithelium. *Clin Orthop Relat Res* 59:21-37, 1968
 9. Khouri RK, Koudsi B, Reddi H: Tissue transformation into bone in vivo. A potential practical application. *Jama* 266:1953-1955, 1991
 10. Albrektsson T, Johansson C: Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10 Suppl 2:S96-101, 2001
 11. Lane JM, Tomin E, Bostrom MP: Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop Relat Res*:S107-117, 1999
 12. De Long WJ: Bone Grafts and Bone Graft Substitutes in Orthopaedic Trauma Surgery. A Critical Analysis. *J Bone Joint Surg Am* 89:649-658, 2007
 13. Habibovic P, de Groot K: Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med* 1:25-32, 2007
 14. de Boer H: The History of Bone Grafts. *Clin Orthop Relat Res* 226:292-298, 1988
 15. Cornell CN, Lane JM: Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res*:S267-273, 1998
 16. Bauer TW, Muschler GF: Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*:10-27, 2000
 17. Boss JH, Shajrawi I, Mendes DG: The nature of the bone-implant interface. The lessons learned from implant retrieval and analysis in man and experimental animal. *Med Prog Technol* 20:119-142, 1994
 18. Glauser R, Schüpbach P: Implantatoberflächen und Osseointegration. *Implantologie Journal* 8:6-10, 2006
 19. Senn on the Healing of Aseptic Bone Cavities by Implantation of Antiseptic Decalcified Bone. *Ann Surg* 10:352-368, 1889
 20. Huggins C: Experimental osteogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 27:349-351, 1930
 21. Huggins C: The formation of bone under the influence of epithelium of the urinary tract. *Arch Surg* 22:377-408, 1931
 22. Wlodarski K: The inductive properties of epithelial established cell lines. *Exp Cell Res* 57:446-448, 1969
 23. Hancox NM, Wlodarski K: The role of host site in bone induction by transplanted xenogenic epithelial cells. *Calcif Tissue Res* 8:258-261, 1972
-

24. Anderson HC: Osteogenetic epithelial-mesenchymal cell interactions. Clin Orthop Relat Res:211-223, 1976
25. Willestaedt H, Levander G, Hult L: Studies in osteogenesis. Acta Orthop Scand 19:419-432, 1950
26. Bridges JB: Experimental heterotopic ossification. Int Rev Cytol 8:253-278, 1959
27. Huggins CB, Urist MR: Dentin matrix transformation: rapid induction of alkaline phosphatase and cartilage. Science 167:896-898, 1970
28. Lacroix P: Recent investigations of the growth of bone. Nature 156:176, 1945
29. Urist MR, Mc LF: Osteogenetic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. J Bone Joint Surg Am 34-A:443-476, 1952
30. Goldhaber P: Osteogenic induction across millipore filters in vivo. Science 133:2065-2067, 1961
31. Summerlee A: Bone formation and development, in Sumner-Smith G (ed): Bone in Clinical Orthopedics (ed 2). Stuttgart New York, Thieme, 2002, pp 1-22
32. Burwell RG: Studies in the Transplantation of Bone. Vii. the Fresh Composite Homograft-Autograft of Cancellous Bone; an Analysis of Factors Leading to Osteogenesis in Marrow Transplants and in Marrow-Containing Bone Grafts. J Bone Joint Surg Br 46:110-140, 1964
33. Burwell RG: Studies in the transplantation of bone. 8. Treated composite homograft-autografts of cancellous bone: an analysis of inductive mechanisms in bone transplantation. J Bone Joint Surg Br 48:532-566, 1966
34. Urist MR, Dowell TA, Hay PH, et al: Inductive substrates for bone formation. Clin Orthop Relat Res 59:59-96, 1968
35. Burwell RG: The fate of bone grafts. London, Churchill Livingstone, 1969, p 115
36. Urist MR, Hay PH, Dubuc F, et al: Osteogenetic competence. Clin Orthop Relat Res 64:194-220, 1969
37. Reddi AH, Huggins C: Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. Proc Natl Acad Sci U S A 69:1601-1605, 1972
38. Reddi AH, Huggins CB: Formation of bone marrow in fibroblast-transformation ossicles. Proc Natl Acad Sci U S A 72:2212-2216, 1975
39. Rath NC, Reddi AH: Collagenous bone matrix is a local mitogen. Nature 278:855-857, 1979
40. Weiss RE, Reddi AH: Role of fibronectin in collagenous matrix-induced mesenchymal cell proliferation and differentiation in vivo. Exp Cell Res 133:247-254, 1981
41. Weiss RE, Reddi AH: Appearance of fibronectin during the differentiation of cartilage, bone, and bone marrow. J Cell Biol 88:630-636, 1981
42. Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N: Biologic principles of bone induction. Orthop Clin North Am 18:207-212, 1987
43. Mundy GR: Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. Clin Orthop Relat Res:24-28, 1996
44. Nade S: The replacement of broken, missing, and diseased bone, in Sumner-Smith G (ed): Bone in Clinical Orthopedics (ed 2). Stuttgart New York, Thieme, 2002, pp 379-410
45. Caplan A: Bone Development Chiba Foundation Symposium (New Series), 1988, pp 3-21
46. Reddi AH, Kuettner KE: Vascular invasion of cartilage: correlation of morphology with lysozyme, glycosaminoglycans, protease, and protease-inhibitory activity during endochondral bone development. Dev Biol 82:217-223, 1981

47. Van de Putte KA, Urist MR: Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin Orthop Relat Res* 43:257-270, 1965
 48. Glowacki J, Mulliken JB: Demineralized bone implants. *Clin Plast Surg* 12:233-241, 1985
 49. Urist MR, Strates BS: Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50:1392-1406, 1971
 50. Chalmers J, Gray DH, Rush J: Observations on the induction of bone in soft tissues. *J Bone Joint Surg Br* 57:36-45, 1975
 51. Gray DH, Speak KS: The control of bone induction in soft tissues. *Clin Orthop Relat Res*:245-250, 1979
 52. Sampath TK, Reddi AH: Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7599-7603, 1981
 53. Sampath TK, Reddi AH: Distribution of bone inductive proteins in mineralized and demineralized extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 119:949-954, 1984
 54. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA: Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 220:680-686, 1983
 55. Sampath TK, Muthukumaran N, Reddi AH: Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7109-7113, 1987
 56. Marks SC, Jr., Popoff SN: Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 183:1-44, 1988
 57. Wang EA, Rosen V, Cordes P, et al: Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9484-9488, 1988
 58. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al: Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528-1534, 1988
 59. Reddi AH, Muthukumaran N, Ma S, et al: Initiation of bone development by osteogenin and promotion by growth factors. *Connect Tissue Res* 20:303-312, 1989
 60. Wozney JM, Rosen V: Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res*:26-37, 1998
 61. Urist MR, Huo YK, Brownell AG, et al: Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:371-375, 1984
 62. Muthukumaran N, Reddi AH: Bone matrix-induced local bone induction. *Clin Orthop Relat Res*:159-164, 1985
 63. Wozney JM: The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 32:160-167, 1992
 64. Reddi AH: Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 4:737-744, 1994
 65. Reddi H: Bone morphogenetic proteins. *Adv Dent Res* 9:13, 1995
 66. Gao T, Lindholm TS, Marttinen A, et al: Composites of bone morphogenetic protein (BMP) and type IV collagen, coral-derived coral hydroxyapatite, and tricalcium phosphate ceramics. *Int Orthop* 20:321-325, 1996
 67. Cook SD, Rueger DC: Osteogenic protein-1: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res*:29-38, 1996
 68. Hogan BL: Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 6:432-438, 1996
 69. Riley EH, Lane JM, Urist MR, et al: Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res*:39-46, 1996
-

70. Iwata H, Sakano S, Itoh T, et al: Demineralized bone matrix and native bone morphogenetic protein in orthopaedic surgery. Clin Orthop Relat Res:99-109, 2002
71. Habibovic P, Sees TM, van den Doel MA, et al: Osteoinduction by biomaterials--physicochemical and structural influences. J Biomed Mater Res A 77:747-762, 2006
72. Winter GD, Simpson BJ: Heterotopic bone formed in a synthetic sponge in the skin of young pigs. Nature 223:88-90, 1969
73. de Groot K: Some considerations about bone-induction. Calcif Tissue Res 13:335-337, 1973
74. Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, et al: Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. Biomaterials 26:6014-6023, 2005
75. Le Nihouannen D, Daculsi G, Saffarzadeh A, et al: Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. Bone 36:1086-1093, 2005
76. Habibovic P, Li J, van der Valk CM, et al: Biological performance of uncoated and octacalcium phosphate-coated Ti6Al4V. Biomaterials 26:23-36, 2005
77. Barrere F, van der Valk CM, Dalmeijer RA, et al: Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants. J Biomed Mater Res A 66:779-788, 2003
78. Gosain AK, Song L, Riordan P, et al: A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. Plast Reconstr Surg 109:619-630, 2002
79. Yuan H, de Bruijn JD, Zhang X, van Blitterswijk CA, de Groot K: Osteoinduction by porous alumina ceramic, in European Conference of Biomaterials. London, UK, 2001
80. Yuan H, de Bruijn JD, Zhang X, et al: Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass (45S5). J Biomed Mater Res 58:270-276, 2001
81. Klein C, de Groot K, Chen W, et al: Osseous substance formation induced in porous calcium phosphate ceramics in soft tissues. Biomaterials 15:31-34, 1994
82. Ripamonti U: The morphogenesis of bone in replicas of porous hydroxyapatite obtained from conversion of calcium carbonate exoskeletons of coral. J Bone Joint Surg Am 73:692-703, 1991
83. Yuan H, Yang Z, Li Y, et al: Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. J Mater Sci Mater Med 9:723-726, 1998
84. Reddi AH: Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. Coll Relat Res 1:209-226, 1981
85. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, et al: Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. Proc Natl Acad Sci U S A 87:2220-2224, 1990
86. Ripamonti U, Van den Heever B, Van Wyk J: Expression of the osteogenic phenotype in porous hydroxyapatite implanted extraskeletally in baboons. Matrix 13:491-502, 1993
87. van Eeden SP, Ripamonti U: Bone differentiation in porous hydroxyapatite in baboons is regulated by the geometry of the substratum: implications for reconstructive craniofacial surgery. Plast Reconstr Surg 93:959-966, 1994
88. Yuan H, Van Den Doel M, Li S, et al: A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats. J Mater Sci Mater Med 13:1271-1275, 2002

89. Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, et al: 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 26:3565-3575, 2005
 90. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI: Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J Orthop Res* 7:568-578, 1989
 91. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI: The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clin Orthop Relat Res*:274-283, 1991
 92. Yang Z, Yuan H, Tong W, et al: Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals. *Biomaterials* 17:2131-2137, 1996
 93. Umemura M, Kawai T, Miki A, et al: [Bone inductive activity of hydroxyapatite-bone morphogenetic protein complex]. *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi* 31:860-869, 1989
 94. Reddi AH: Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr Opin Cell Biol* 4:850-855, 1992
 95. Yuan H, De Bruijn JD, Zhang X, et al: Use of an osteoinductive biomaterial as a bone morphogenetic protein carrier. *J Mater Sci Mater Med* 12:761-766, 2001
 96. Liu Y, de Groot K, Hunziker EB: BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. *Bone* 36:745-757, 2005
 97. Yuan H, Yang Z, De Bruijn JD, et al: Material-dependent bone induction by calcium phosphate ceramics: a 2.5-year study in dog. *Biomaterials* 22:2617-2623, 2001
 98. Urist MR, Jurist JM, Jr., Dubuc FL, et al: Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 68:279-293, 1970
 99. Thielemann FW, Spaeth G, Veihelmann D, et al: Osteoinduction. Part I: Test model and comparative long term observation of allogenic and xenogenic matrix implants. *Arch Orthop Trauma Surg* 99:217-222, 1982
 100. Ekelund A, Brosjo O, Nilsson OS: Experimental induction of heterotopic bone. *Clin Orthop Relat Res*:102-112, 1991
 101. O'Connor JP: Animal models of heterotopic ossification. *Clin Orthop Relat Res*:71-80, 1998
 102. An Y, Friedman RJ: Animal Models of Bone Defect Repair, in An Y, Friedman RJ (ed): *Animal Models in Orthopaedic Research*. Boca Raton, CRC Press, 1999, pp 241-260
 103. Cornell CN: Osteobiologics. *Bull Hosp Jt Dis* 62:13-17, 2004
 104. Nade S, Burwell RG: Decalcified bone as a substrate for osteogenesis. An appraisal of the interrelation of bone and marrow in combined grafts. *J Bone Joint Surg Br* 59:189-196, 1977
 105. Fackelman GE, von Rechenberg B, Fetter AW: Decalcified bone grafts in the horse. *Am J Vet Res* 42:943-948, 1981
 106. Solheim E: Osteoinduction by demineralised bone. *Int Orthop* 22:335-342, 1998
 107. Yuan H: Osteoinduction of calcium phosphates, in Biomaterials Research Group. Leiden, Leiden University, 2001, pp 1-156
 108. Toth JLK, Hackbarth DA: Ceramic-induced osteogenesis following subcutaneous implantation of calcium phosphates. *Biomaterials* 13:31-34, 1993
 109. Yuan H, van Blitterswijk CA, de Groot K, et al: Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds. *Tissue Eng* 12:1607-1615, 2006
 110. Habibovic P, Kruijff MC, Juhl MV, et al: Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes. *J Orthop Res* 26:1363-1370, 2008
-

111. Ripamonti U: Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials* 17:31-35, 1996
112. Yang ZJ, Yuan H, Zou P, et al: Osteogenic responses to extraskelentially implanted synthetic porous calcium phosphate ceramics: an early stage histomorphological study in dogs. *J Mater Sci Mater Med* 8:697-701, 1997
113. Ripamonti U: The induction of bone in osteogenic composites of bone matrix and porous hydroxyapatite replicas: an experimental study on the baboon (*Papio ursinus*). *J Oral Maxillofac Surg* 49:817-830, 1991
114. Yamasaki H, Sakai H: Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. *Biomaterials* 13:308-312, 1992
115. Sires BS, Holds JB, Kincaid MC, et al: Osteogenin-enhanced bone-specific differentiation in hydroxyapatite orbital implants. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 13:244-251, 1997
116. Yuan H, Yang Z, Zou P, Li Y, Zhang X: Rapid osteogenesis in porous biphasic calcium phosphate ceramics in domestic pigs. *Biomed Eng Appl Bas Com* 9:268-273, 1997
117. Kawai N, Niwa S, Sato M, et al: Bone formation by cells from femurs cultured among three-dimensionally arranged hydroxyapatite granules. *J Biomed Mater Res* 37:1-8, 1997
118. Pettis GY, Kaban LB, Glowacki J: Tissue response to composite ceramic hydroxyapatite/demineralized bone implants. *J Oral Maxillofac Surg* 48:1068-1074, 1990
119. Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, et al: Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthotopic defect. *J Orthop Res* 24:867-876, 2006
120. Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, et al: Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials* 29:1177-1188, 2008
121. Buckwalter JA, Cooper RR: Bone structure and function. *Instr Course Lect* 36:27-48, 1987
122. Biltz RM, Pellegrino ED: The chemical anatomy of bone. I. A comparative study of bone composition in sixteen vertebrates. *J Bone Joint Surg Am* 51:456-466, 1969
123. Misra D: Surface chemistry of bone and tooth mineral, in Dickson G (ed): *Methods of calcified tissue preparation*. Amsterdam New York, Elsevier, 1984, pp 435-465
124. Biltz RM, Pellegrino ED: The nature of bone carbonate. *Clin Orthop Relat Res*:279-292, 1977
125. Posner AS: "The chemistry of bone mineral". *Bull Hosp Joint Dis* 39:126-144, 1978
126. Posner AS: The mineral of bone. *Clin Orthop Relat Res*:87-99, 1985
127. Parfitt A: The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data, in Recker R (ed): *Bone in histomorphometry: techniques and interpretation*. Boca Raton, CRC Press, 1990, pp 143-223
128. Keene DR, Sakai LY, Burgeson RE: Human bone contains type III collagen, type VI collagen, and fibrillin: type III collagen is present on specific fibers that may mediate attachment of tendons, ligaments, and periosteum to calcified bone cortex. *J Histochem Cytochem* 39:59-69, 1991
129. Eyre D: Biochemical basis of collagen metabolites as bone turnover markers, in Bilezikian JP RL, Rodan GA (ed): *Principles of bone biology*. San Diego, Academic Press, 1996, pp 143-153

130. Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrati MD, et al: Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J Biol Chem* 261:12665-12674, 1986
 131. Mohan S, Baylink DJ: Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res*:30-48, 1991
 132. Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S: Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* 8 Suppl 2:S565-572, 1993
 133. Habal MB, Reddi AH: Bone grafts and bone induction substitutes. *Clin Plast Surg* 21:525-542, 1994
 134. Wozney JM: Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res* 1:267-280, 1989
 135. Aldinger G, Beyer A, Schmid U, et al: [Fundamental aspects of osteoinductive activity of bone tissue and potential clinical application]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 134:205-209, 1996
 136. Reddi AH: Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res*:S66-72, 1998
 137. Chen D, Zhao M, Mundy GR: Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22:233-241, 2004
 138. Okamoto M, Murai J, Yoshikawa H, et al: Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. *J Bone Miner Res* 21:1022-1033, 2006
 139. Hynes RO: Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-554, 1987
 140. Ruoslahti E, Pierschbacher MD: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238:491-497, 1987
 141. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, et al: Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instr Course Lect* 45:387-399, 1996
 142. Ng KW, Romas E, Donnan L, et al: Bone biology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 11:1-22, 1997
 143. Raisz LG: Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 45:1353-1358, 1999
 144. Hadjidakis DJ, Androulakis, II: Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1092:385-396, 2006
 145. Rodan GA: Introduction to bone biology. *Bone* 13 Suppl 1:S3-6, 1992
 146. Kartsogiannis V, Ng KW: Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol* 228:79-102, 2004
 147. Boskey AL, Posner AS: Bone structure, composition, and mineralization. *Orthop Clin North Am* 15:597-612, 1984
 148. Marks SC, Hermey, DC: The structure and development of bone, in Bilezikian JP, Rodan GA (ed): *Principles of bone biology*. San Diego, Academic Press, 1996, pp 3-14
 149. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ: Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 55:287-299, 1994
 150. Kogianni G, Noble BS: The biology of osteocytes. *Curr Osteoporos Rep* 5:81-86, 2007
 151. Schwarz E, O'Keefe R: Breakthrough in bone: the molecular mechanism of osteoclast/ osteoblast coupling. *Curr Opin Orthop* 11:329-335, 2000
 152. Schenk R, Willenegger H: [on the Histological Picture of So-Called Primary Healing of Pressure Osteosynthesis in Experimental Osteotomies in the Dog.]. *Experientia* 19:593-595, 1963
 153. Willenegger H, Perren SM, Schenk R: [Primary and secondary healing of bone fractures]. *Chirurg* 42:241-252, 1971
-

154. Schenk RK, Willenegger HR: [Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect (author's transl)]. Unfallheilkunde 80:155-160, 1977
155. Probst A, Spiegel HU: Cellular mechanisms of bone repair. J Invest Surg 10:77-86, 1997
156. Deuel TF, Senior RM, Huang JS, et al: Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. J Clin Invest 69:1046-1049, 1982
157. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, et al: Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. J Exp Med 165:251-256, 1987
158. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, et al: Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. Proc Natl Acad Sci U S A 84:5788-5792, 1987
159. Birkenhauer BBT, Schlenzka R: Physiologie und Morphologie der knöchernen Heilung. Wundforum 1:14-17, 1997
160. Rhan B: Bone healing: histological and physiologic concepts, in Sumner-Smith G (ed): Bone in Clinical Orthopedics (ed 2). Stuttgart New York, Thieme, 2002, pp 287-326
161. Brighton CT, Hunt RM: Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. J Bone Joint Surg Am 73:832-847, 1991
162. Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, et al: Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. Periodontol 2000 41:48-72, 2006
163. Frost HM: The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. Clin Orthop Relat Res:283-293, 1989
164. Pfeilschifter J, Mundy GR: Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. Proc Natl Acad Sci U S A 84:2024-2028, 1987
165. Pfeilschifter J, Wolf O, Naumann A, et al: Chemotactic response of osteoblastlike cells to transforming growth factor beta. J Bone Miner Res 5:825-830, 1990
166. Bolander ME: Regulation of fracture repair by growth factors. Proc Soc Exp Biol Med 200:165-170, 1992
167. Andrew JG, Hoyland J, Andrew SM, et al: Demonstration of TGF-beta 1 mRNA by in situ hybridization in normal human fracture healing. Calcif Tissue Int 52:74-78, 1993
168. Andrew JG, Hoyland J, Freemont AJ, et al: Insulinlike growth factor gene expression in human fracture callus. Calcif Tissue Int 53:97-102, 1993
169. Katagiri T, Takahashi N: Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. Oral Dis 8:147-159, 2002
170. Ham AHW: Repair and transplantation of bone. New York, Academic Press, 1971, pp 337-399
171. Janeway HH: V. Autoplastic Transplantation of Bone. Ann Surg 52:217-228, 1910
172. de Boer H: The History of Bone Grafts. Clinical Orthopaedics and Related Research:292-298, 1988
173. Albee F: Fundamentals in bone transplantation. J Am Med Assoc 81:142 149, 1923
174. Sanan A, Haines SJ: Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. Neurosurgery 40:588-603, 1997
175. Walter von P: Wiedereinheilung der bei der Trapanation ausgebohrten Knochenscheibe Journal der Chirurgie und Augen-Heilkunde 2:571, 1821

176. Macewen W: Observations concerning transplantation on bone. Proc R Soc Lond 32:232, 1881
 177. Jarcho M: Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clin Orthop Relat Res:259-278, 1981
 178. Hench LL, Wilson J: Surface-active biomaterials. Science 226:630-636, 1984
 179. Bucholz RW, Carlton A, Holmes RE: Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes. Orthop Clin North Am 18:323-334, 1987
 180. Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, et al: Role of bone substitutes. Clin Orthop Relat Res:55-65, 1996
 181. Szpalski M, Gunzburg R: Applications of calcium phosphate-based cancellous bone void fillers in trauma surgery. Orthopedics 25:s601-609, 2002
 182. Glicenstein J: [History of bone reconstruction]. Ann Chir Plast Esthet 45:171-174, 2000
 183. Johnson A: Bone Transplantation. Berlin Heidelberg, Springer Verlag, 1998
 184. Rechenberg von BAJ: Bone grafts and replacement, in Auer JS, J (ed): Equine Surgery. Philadelphia, WB Saunders, 1999, pp 639-643
 185. Ramakrishna S: An introduction to biocomposites. London, River Edge, NJ, Imperial College Press; distributed by World Scientific Pub, 2004, pp 18-33
 186. Citardi MJ, Friedman CD: Nonvascularized autogenous bone grafts for craniofacial skeletal augmentation and replacement. Otolaryngol Clin North Am 27:891-910, 1994
 187. Barth A: Ueber histologische Befunde nach Knochenimplantationen. Arch Klin Chir 46:409, 1893
 188. Phemister D: The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. Surg Gynecol Obstet 19:303, 1914
 189. Brown KL, Cruess RL: Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. A review. J Bone Joint Surg Am 64:270-279, 1982
 190. Coombes AG, Meikle MC: Resorbable synthetic polymers as replacements for bone graft. Clin Mater 17:35-67, 1994
 191. Burchardt H: The biology of bone graft repair. Clin Orthop Relat Res:28-42, 1983
 192. Roesgen M: Die Regenerationsfähigkeit des Beckenkammes nach Spongiosaentnahme beim Menschen - Induktion durch Phosphatkeramiken? Teil +. Unfallchirurgie Nr 5:258-265, 1990
 193. Misch CE, Dietsh F: Bone-grafting materials in implant dentistry. Implant Dent 2:158-167, 1993
 194. Moore WR, Graves SE, Bain GI: Synthetic bone graft substitutes. ANZ J Surg 71:354-361, 2001
 195. Vaccaro AR: The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. Orthopedics 25:s571-578, 2002
 196. Rueger JM: [Bone substitution materials. Current status and prospects]. Orthopade 27:72-79, 1998
 197. Sarkar MR, Wachter N, Patka P, et al: First histological observations on the incorporation of a novel calcium phosphate bone substitute material in human cancellous bone. J Biomed Mater Res 58:329-334, 2001
 198. Gisepp A: Research on ceramic bone substitutes: current status. Injury 33 Suppl 2:B88-92, 2002
 199. Cockin J: Autologous bone grafting-complications at the donor site. J Bone Joint Surg B 53:153, 1971
 200. Gerngross H, Burri C, Kinzl L, et al: [Complications at removal sites of autologous cancellous bone transplants]. Aktuelle Traumatol 12:146-152, 1982
-

201. Kurz LT, Garfin SR, Booth RE, Jr.: Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques. *Spine* 14:1324-1331, 1989
202. Younger EM, Chapman MW: Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 3:192-195, 1989
203. Friedman CD, Costantino PD: General concepts in craniofacial skeletal augmentation and replacement. *Otolaryngol Clin North Am* 27:847-857, 1994
204. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, et al: Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res*:300-309, 1996
205. Finkemeier CG: Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 84-A:454-464, 2002
206. Urist MR, Silverman BF, Buring K, et al: The bone induction principle. *Clin Orthop Relat Res* 53:243-283, 1967
207. Brantigan JW, Cunningham BW, Warden K, et al: Compression strength of donor bone for posterior lumbar interbody fusion. *Spine* 18:1213-1221, 1993
208. Lane JM, Sandhu HS: Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am* 18:213-225, 1987
209. Anderson ML, Dhert WJ, de Bruijn JD, et al: Critical size defect in the goat's os ilium. A model to evaluate bone grafts and substitutes. *Clin Orthop Relat Res*:231-239, 1999
210. Mankin HJ, Gebhardt MC, Tomford WW: The use of frozen cadaveric allografts in the management of patients with bone tumors of the extremities. *Orthop Clin North Am* 18:275-289, 1987
211. Horowitz MC, Friedlaender GE: Immunologic aspects of bone transplantation. A rationale for future studies. *Orthop Clin North Am* 18:227-233, 1987
212. Hofmann GO, Kirschner MH, Wangemann T, et al: Infections and immunological hazards of allogeneic bone transplantation. *Arch Orthop Trauma Surg* 114:159-166, 1995
213. Erbe EM, Marx JG, Clineff TD, et al: Potential of an ultraporous beta-tricalcium phosphate synthetic cancellous bone void filler and bone marrow aspirate composite graft. *Eur Spine J* 10 Suppl 2:S141-146, 2001
214. Rueger JM: [Bone substitutes. State of the art and: what lies ahead?]. *Unfallchirurg* 99:228-236, 1996
215. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E: Bone substitutes: an update. *Injury* 36 Suppl 3:S20-27, 2005
216. Govindaraj S, Costantino PD, Friedman CD: Current use of bone substitutes in maxillofacial surgery. *Facial Plast Surg* 15:73-81, 1999
217. Albee FH: Studies in Bone Growth: Triple Calcium Phosphate as a Stimulus to Osteogenesis. *Ann Surg* 71:32-39, 1920
218. Böhner M: Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 31 Suppl 4:37-47, 2000
219. Driessens F, Verbeeck, R: Relation between physico-chemical solubility and biodegradability of calcium phosphates, in de Putter CdL, GL; de Groot, K; Lee, AJC; (ed): *Implant materials in biofunction. Advances in Biomaterial.* Amsterdam, Elsevier, 1988, pp 105-111
220. Eggli PS, Müller W, Schenk RK: Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. *Clin Orthop Relat Res*:127-138, 1988
221. Klein CP, Patka P, den Hollander W: Macroporous calcium phosphate bioceramics in dog femora: a histological study of interface and biodegradation. *Biomaterials* 10:59-62, 1989

- 222. Lu JX, Flautre B, Anselme K, et al: Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *J Mater Sci Mater Med* 10:111-120, 1999
 - 223. Costantino PD, Hiltzik D, Govindaraj S, et al: Bone healing and bone substitutes. *Facial Plast Surg* 18:13-26, 2002
 - 224. LeGeros RZ: Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater* 14:65-88, 1993
 - 225. Cornell CN: Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 30:591-598, 1999
 - 226. Theiss F, Apelt D, Brand B, et al: Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 26:4383-4394, 2005
 - 227. Hench LL: Biomaterials. *Science* 208:826-831, 1980
 - 228. Beckham CA, Greenlee TK, Jr., Crebo AR: Bone formation at a ceramic implant interface. *Calcif Tissue Res* 8:165-171, 1971
 - 229. Tracy BM, Doremus RH: Direct electron microscopy studies of the bone-hydroxylapatite interface. *J Biomed Mater Res* 18:719-726, 1984
 - 230. Ayers RA, Wolford LM, Bateman TA, et al: Quantification of bone ingrowth into porous block hydroxyapatite in humans. *J Biomed Mater Res* 47:54-59, 1999
 - 231. Takeshita F, Iyama S, Ayukawa Y, et al: Study of bone formation around dense hydroxyapatite implants using light microscopy, image processing and confocal laser scanning microscopy. *Biomaterials* 18:317-322, 1997
 - 232. Kuemmerle JM, Oberle A, Oechsli C, et al: Assessment of the suitability of a new brushite calcium phosphate cement for cranioplasty - an experimental study in sheep. *J Craniomaxillofac Surg* 33:37-44, 2005
 - 233. Costantino PD, Friedman CD: Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol Clin North Am* 27:1037-1074, 1994
 - 234. Nery EB, Pflughoeft FA, Lynch KL, et al: Functional loading of bioceramic augmented alveolar ridge--a pilot study. *J Prosthet Dent* 43:338-343, 1980
 - 235. Daculsi G, Laboux O, Malard O, et al: Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med* 14:195-200, 2003
 - 236. Nakamura T: Bioceramics in orthopedic surgery. *Bioceramics* 9:31-34, 1996
 - 237. Geesink RG, de Groot K, Klein CP: Bonding of bone to apatite-coated implants. *J Bone Joint Surg Br* 70:17-22, 1988
 - 238. Niedhart C, Maus U, Redmann E, et al: In vivo testing of a new in situ setting beta-tricalcium phosphate cement for osseous reconstruction. *J Biomed Mater Res* 55:530-537, 2001
 - 239. Glowacki J, Altobelli D, Mulliken JB: Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects. *Calcif Tissue Int* 33:71-76, 1981
 - 240. Walsh WR, Vizesi F, Michael D, et al: Beta-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. *Biomaterials* 29:266-271, 2008
 - 241. Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, et al: Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res* 4:433-456, 1970
 - 242. Karageorgiou V, Kaplan D: Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26:5474-5491, 2005
 - 243. Klawitter JJHS: Application of porous ceramics for the attachment of load bearing orthopedic applications. *J Biomed Mater Res Symp* 2:161, 1971
 - 244. Daculsi G, Passuti N: Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 11:86-87, 1990
-

245. Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, et al: Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 19:133-139, 1998
246. Chang BS, Lee CK, Hong KS, et al: Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials* 21:1291-1298, 2000
247. Böhner M, Baumgart F: Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. *Biomaterials* 25:3569-3582, 2004
248. Galois L, Mainard D: Bone ingrowth into two porous ceramics with different pore sizes: an experimental study. *Acta Orthop Belg* 70:598-603, 2004
249. Schenk R: Zur Problematik der Knochenersatzstoffe: Histophysiologie des Knochenumbaus und der Substitution von Knochenersatzstoffen. *Hefte der Unfallheilkunde* 216:23-35, 1991
250. Cohen MC, PD; Friedman CD: Biology of implants used in head and neck surgery. *Facial Plast Surg Clin North Am* 7:17-33, 1999
251. Ripamonti U: Bone induction in nonhuman primates. An experimental study on the baboon. *Clin Orthop Relat Res*:284-294, 1991
252. Ripamonti U, Ma S, Reddi AH: The critical role of geometry of porous hydroxyapatite delivery system in induction of bone by osteogenin, a bone morphogenetic protein. *Matrix* 12:202-212, 1992
253. Reddi AH: Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng* 6:351-359, 2000
254. Ripamonti U: Soluble, insoluble and geometric signals sculpt the architecture of mineralized tissues. *J Cell Mol Med* 8:169-180, 2004
255. Rechenberg v B: Biotechnology, in Rüedi T, Buckley RE, Moran CG (ed): *AO-Prinzipien des Frakturmanagments* (ed 2) Georg Thieme Verlag KG, 2008
256. Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 260:920-926, 1993
257. Wu CH, Hara K, Ozawa H: Enhanced osteoinduction by intramuscular grafting of BMP-beta-TCP compound pellets into murine models. *Arch Histol Cytol* 55:97-112, 1992
258. Hotz G, Herr G: Bone substitute with osteoinductive biomaterials--current and future clinical applications. *Int J Oral Maxillofac Surg* 23:413-417, 1994
259. Boden SD: Bioactive factors for bone tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res*:S84-94, 1999
260. Bruder SP, Fox BS: Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin Orthop Relat Res*:S68-83, 1999
261. Saitoh H, Takata T, Nikai H, et al: Effect of polylactic acid on osteoinduction of demineralized bone: preliminary study of the usefulness of polylactic acid as a carrier of bone morphogenetic protein. *J Oral Rehabil* 21:431-438, 1994
262. Hollinger JO, Uludag H, Winn SR: Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Adv Drug Deliv Rev* 31:303-318, 1998
263. Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, et al: BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res* 39:190-199, 1998
264. Boyan BD, Lohmann CH, Somers A, et al: Potential of porous poly-D,L-lactide-co-glycolide particles as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2 during osteoinduction in vivo. *J Biomed Mater Res* 46:51-59, 1999
265. Winn SR, Uludag H, Hollinger JO: Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res*:S95-106, 1999
266. Kusumoto KBK, Fujimura K, Akioka J, Ogawa Y, Iizuka T: Comparison of ectopic osteoinduction in vivo by recombinant human BMP-2 and recombinant

- Xenopus BMP-4/7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun* 239:575-579, 1997
267. Cole BJ, Bostrom MP, Pritchard TL, et al: Use of bone morphogenetic protein 2 on ectopic porous coated implants in the rat. *Clin Orthop Relat Res*:219-228, 1997
268. Aspenberg P, Turek T: BMP-2 for intramuscular bone induction: effect in squirrel monkeys is dependent on implantation site. *Acta Orthop Scand* 67:3-6, 1996
269. Eniwumide JO, Yuan H, Cartmell SH, et al: Ectopic bone formation in bone marrow stem cell seeded calcium phosphate scaffolds as compared to autograft and (cell seeded) allograft. *Eur Cell Mater* 14:30-38; discussion 39, 2007
270. Vacanti CA, Kim W, Schloo B, et al: Joint resurfacing with cartilage grown in situ from cell-polymer structures. *Am J Sports Med* 22:485-488, 1994
271. Ishida H, Tamai S, Yajima H, et al: Histologic and biochemical analysis of osteogenic capacity of vascularized periosteum. *Plast Reconstr Surg* 97:512-518, 1996
272. Alvis M, Lalor P, Brown MK, et al: Osteoinduction by a collagen mineral composite combined with isologous bone marrow in a subcutaneous rat model. *Orthopedics* 26:77-80, 2003
273. Harris CT, Cooper LF: Comparison of bone graft matrices for human mesenchymal stem cell-directed osteogenesis. *J Biomed Mater Res A* 68:747-755, 2004
274. Lane JM, Yasko AW, Tomin E, et al: Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair. *Clin Orthop Relat Res*:216-227, 1999
275. El-Ghannam A: Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. *Expert Rev Med Devices* 2:87-101, 2005
276. Dickson G, Buchanan F, Marsh D, et al: Orthopaedic tissue engineering and bone regeneration. *Technol Health Care* 15:57-67, 2007
277. Magan A, Ripamonti U: Geometry of porous hydroxyapatite implants influences osteogenesis in baboons (*Papio ursinus*). *J Craniofac Surg* 7:71-78, 1996
278. Yuan H, De Bruijn JD, Li Y, et al: Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous alpha-TCP and beta-TCP. *J Mater Sci Mater Med* 12:7-13, 2001
279. Fujibayashi S, Neo M, Kim HM, et al: Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials* 25:443-450, 2004
280. Legeros RZ, Trautz OR, Legeros JP, et al: Apatite Crystallites: Effects of Carbonate on Morphology. *Science* 155:1409-1411, 1967
281. Levitt SR, Crayton PH, Monroe EA, et al: Forming method for apatite prostheses. *J Biomed Mater Res* 3:683-684, 1969
282. Boyde A, Corsi A, Quarto R, et al: Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone* 24:579-589, 1999
283. Daculsi G, LeGeros RZ, Heughebaert M, et al: Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif Tissue Int* 46:20-27, 1990
284. Chang YL, Stanford CM, Keller JC: Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: implications for hydroxyapatite (HA)-enhanced bone formation. *J Biomed Mater Res* 52:270-278, 2000
285. Heughebaert M, LeGeros RZ, Gineste M, et al: Physicochemical characterization of deposits associated with HA ceramics implanted in nonosseous sites. *J Biomed Mater Res* 22:257-268, 1988
-

286. De Groot J: Carriers that concentrate native bone morphogenetic protein in vivo. *Tissue Eng* 4:337-341, 1998
287. Villarreal DR, Sogal A, Ong JL: Protein adsorption and osteoblast responses to different calcium phosphate surfaces. *J Oral Implantol* 24:67-73, 1998
288. Koerten HK, van der Meulen J: Degradation of calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 44:78-86, 1999
289. Oonishi H, Hench LL, Wilson J, et al: Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. *J Biomed Mater Res* 44:31-43, 1999
290. Yuan H, Kurashina K, de Bruijn JD, et al: A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 20:1799-1806, 1999
291. Habibovic P, van der Valk CM, van Blitterswijk CA, et al: Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 15:373-380, 2004
292. Christenson EM, Anseth KS, van den Beucken JJ, et al: Nanobiomaterial applications in orthopedics. *J Orthop Res* 25:11-22, 2007
293. Hanawa T, Kamiura Y, Yamamoto S, et al: Early bone formation around calcium-ion-implanted titanium inserted into rat tibia. *J Biomed Mater Res* 36:131-136, 1997
294. Le Huec JC, Clement D, Brouillaud B, et al: Evolution of the local calcium content around irradiated beta-tricalcium phosphate ceramic implants: in vivo study in the rabbit. *Biomaterials* 19:733-738, 1998
295. Krut MC, de Bruijn JD, Yuan H, et al: Optimization of bone tissue engineering in goats: a peroperative seeding method using cryopreserved cells and localized bone formation in calcium phosphate scaffolds. *Transplantation* 77:359-365, 2004
296. Edwards JT, Diegmann MH, Scarborough NL: Osteoinduction of human demineralized bone: characterization in a rat model. *Clin Orthop Relat Res*:219-228, 1998
297. Taddei F, Viceconti M, Manfrini M, et al: Growth and remodelling of the autologous bone transplant used in a pediatric femoral reconstruction. *Proc Inst Mech Eng [H]* 216:95-104, 2002
298. Han B, Tang B, Nimni ME: Quantitative and sensitive in vitro assay for osteoinductive activity of demineralized bone matrix. *J Orthop Res* 21:648-654, 2003
299. Burchardt H: Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 18:187-196, 1987
300. Brighton CT, Lorch DG, Kupcha R, et al: The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop Relat Res*:287-299, 1992
301. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alonso A, et al: Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res*:280-286, 1992
302. Harakas NK: Demineralized bone-matrix-induced osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res*:239-251, 1984
303. Mulliken JB, Kaban LB, Glowacki J: Induced osteogenesis--the biological principle and clinical applications. *J Surg Res* 37:487-496, 1984
304. Hosny M, Sharawy M: Osteoinduction in young and old rats using demineralized bone powder allografts. *J Oral Maxillofac Surg* 43:925-931, 1985
305. Hosny M, Sharawy M: Osteoinduction in rhesus monkeys using demineralized bone powder allografts. *J Oral Maxillofac Surg* 43:837-844, 1985

306. Gerber T, Holzhüter G, Götz W, Bienengräber V, Henkel KO, Rumpels E: Nanostructuring of Biomaterials - A Pathway to Bone Grafting Substitute. *European Journal of Trauma* 2:132-140, 2006
 307. Eid K, Zelicof S, Perona BP, et al: Tissue reactions to particles of bone-substitute materials in intraosseous and heterotopic sites in rats: discrimination of osteoinduction, osteocompatibility, and inflammation. *J Orthop Res* 19:962-969, 2001
 308. Kondo N, Ogoose A, Tokunaga K, et al: Osteoinduction with highly purified beta-tricalcium phosphate in dog dorsal muscles and the proliferation of osteoclasts before heterotopic bone formation. *Biomaterials* 27:4419-4427, 2006
 309. Nunamaker DM: Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*:S56-65, 1998
 310. Yuan H, van Blitterswijk CA, de Groot K, et al: A comparison of bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) implanted in muscle and bone of dogs at different time periods. *J Biomed Mater Res A* 78:139-147, 2006
 311. Habibovic P, Gbureck U, Doillon CJ, et al: Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials* 29:944-953, 2008
 312. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, et al: Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139:663-670, 1998
 313. An YFR: Animal Selections in Orthopaedic Research, in An YFR (ed): *Animal Models in Orthopaedic Research*. Boca Raton, CRC Press LLC, 1999, pp 39-57
 314. Glowacki J, Kaban LB, Murray JE, et al: Bone implants and induced osteogenesis. *Lancet* 1:452, 1982
 315. Wozney JM, Rosen V, Byrne M, et al: Growth factors influencing bone development. *J Cell Sci Suppl* 13:149-156, 1990
 316. Cowles EA, DeRome ME, Pastizzo G, et al: Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. *Calcif Tissue Int* 62:74-82, 1998
 317. Asou Y, Rittling SR, Yoshitake H, et al: Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology* 142:1325-1332, 2001
 318. Sykaras N, Opperman LA: Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *J Oral Sci* 45:57-73, 2003
 319. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, et al: Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 153:1133-1140, 2001
 320. Marusic A, Katavic V, Grcevic D, et al: Genetic variability of new bone induction in mice. *Bone* 25:25-32, 1999
 321. Neidlinger-Wilke: Biokompatibilität von Implantatmaterialien, in Vorlesungsskript Biomechanik; Biokompatibilität: Anwendung moderner Erkenntnis der Biomechanik für die Behandlung von orthopädische und unfallchirurgische Patienten. Uni Ulm, 2006
 322. Anderson J: Inflammation, Wound Healing and the Foreign-Body Response, in Ratner B, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (ed): *Biomaterials Science - An introduction to Materials in Medicine* (ed 2). San Diego, Elsevier Academic Press, 2004, pp 296-304
 323. Benghuzzi H: Cytological evaluation of capsular tissue surrounding TCPL implant in adult rats. *Biomed Sci Instrum* 32:81-86, 1996
-

- 324. Batniji RK, Hutchison JL, Dahiya R, et al: Tissue response to expanded polytetrafluoroethylene and silicone implants in a rabbit model. Arch Facial Plast Surg 4:111-113, 2002
- 325. Schoen F: Host Reactions to Biomaterials and their Evaluation - Introduction, in Ratner B, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (ed): Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine (ed 2). San Diego Elsevier Academic Press, 2004, pp 293-296
- 326. Mitchell R: Innate and Adaptive Immunity: The Immune Response to Foreign Materials, in Ratner B, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (ed): Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine (ed 2). San Diego, Elsevier Academic Press, 2004, pp 304-318

Abkürzungsverzeichnis

BMP	Bone Morphogenetic Protein
DBM	demineralized bone matrix/ demineralisierte Knochenmatrix
DCP	Dikalziumphosphat
FDF	Fibroblastic Growth Factor
HA	Hydroxylapatit
IGF	Insulins-like Growth Factor
i.m.	intramuskulär
MMA	Methylmethacrylat
OGP	Osteogenic Growth Peptide
PDGF	Plateled derived Growth Factor
s.c.	subkutan
SiO ₂	Siliziumdioxid
β-TCP	beta-Trikalizumphosphat
TGF-β	Transforming Growth Factor β

Anhang

Abbildungen

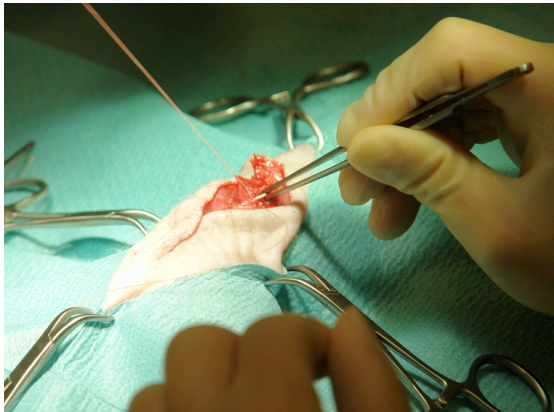


Abb. 1: Operation, Implantation des Knochenersatzmaterials



Abb. 2: Nanobone[®] Granulat



Abb. 3: Nexus IC[®]

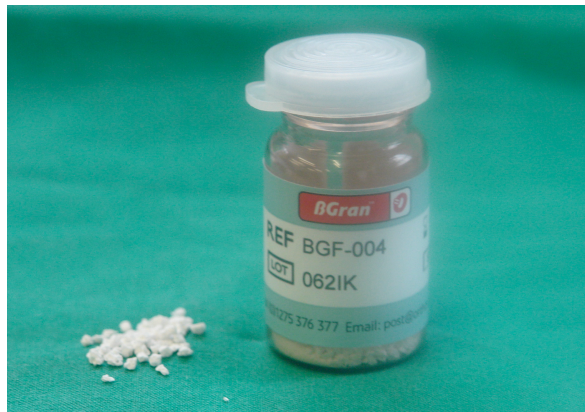


Abb. 4: betaGran[®] Granulat



Abb. 5: Nanobone® Dickschnitt
Übersicht i.m. Implantation



Abb. 6: Nanobone® Dickschnitt
Übersicht s.c. Implantation

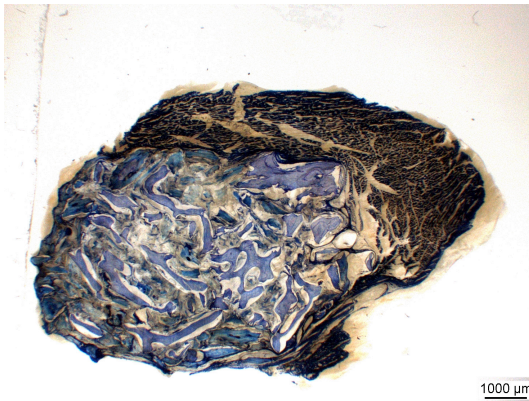


Abb. 7: Nexus IC® Dickschnitt
Übersicht i.m. Implantation



Abb. 8: Nexus IC® Dickschnitt
Übersicht s.c. Implantation

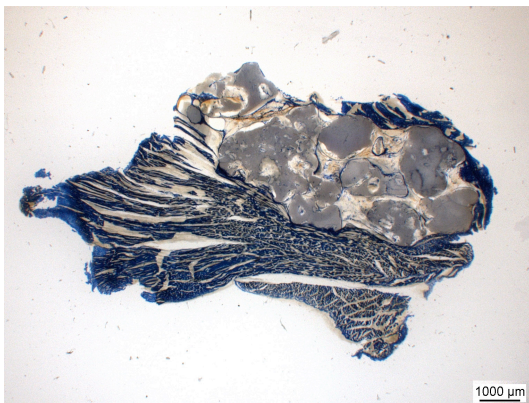


Abb. 9: betaGran® Dickschnitt
Übersicht i.m. Implantation

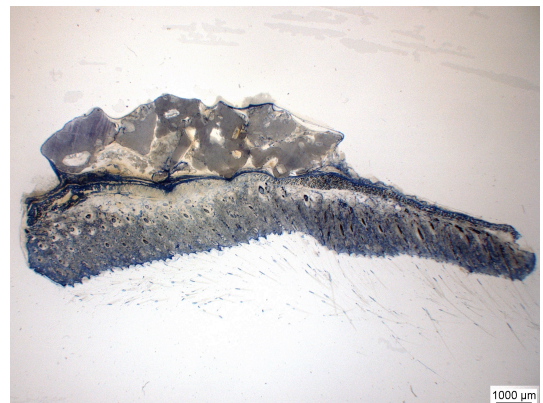


Abb. 10: betaGran® Dickschnitt
Übersicht s.c. Implantation

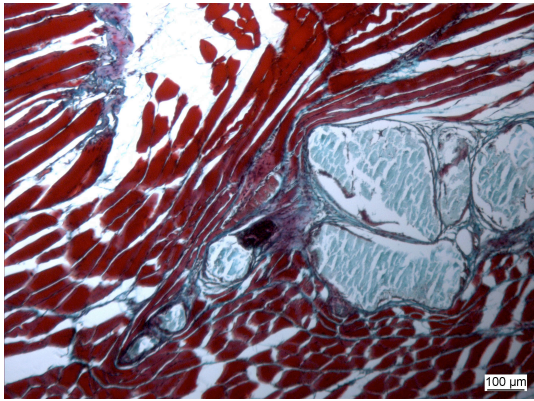


Abb. 11: NanoBone® Dünnschnitt
Masson-Goldner i.m.

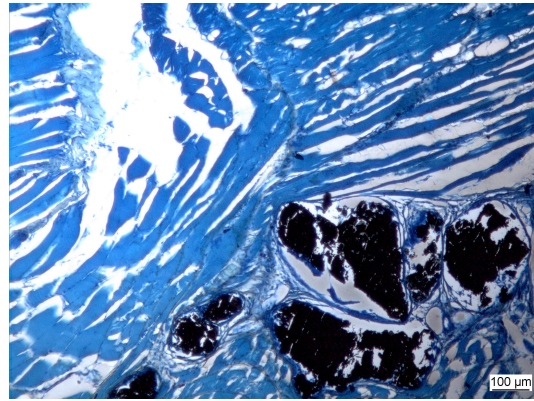


Abb. 12: NanoBone® Dünnschnitt
von Kossa/McNeal i.m.

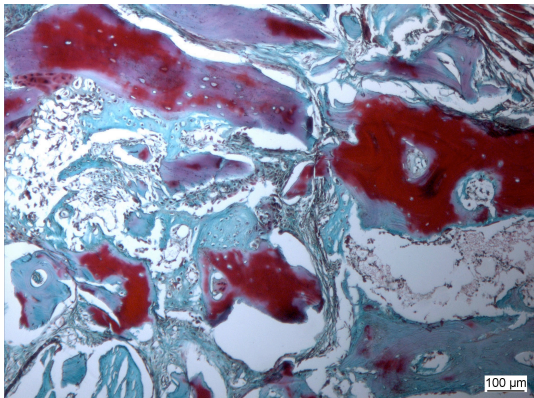


Abb. 13: Nexus IC® Dünnschnitt
Masson-Goldner i.m.

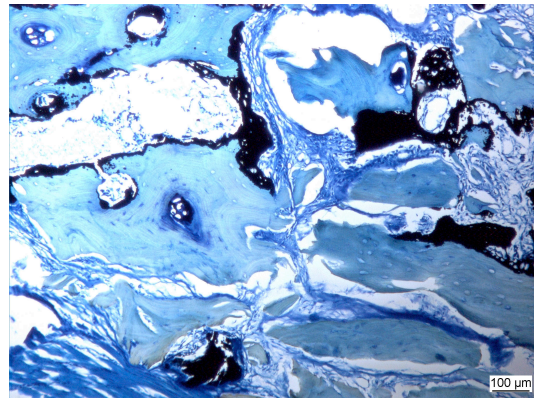


Abb. 14: Nexus IC® Dünnschnitt
von Kossa/McNeal i.m.

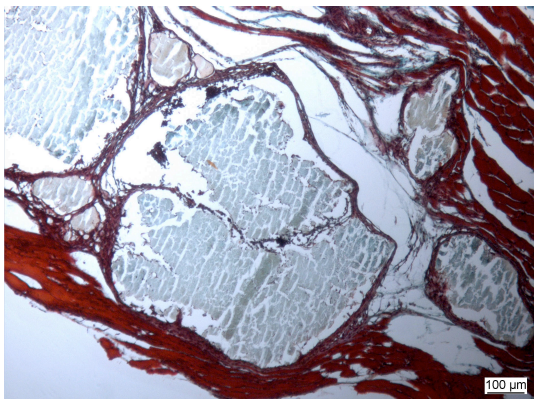


Abb. 15: betaGran® Dünnschnitt
Masson-Goldner i.m.

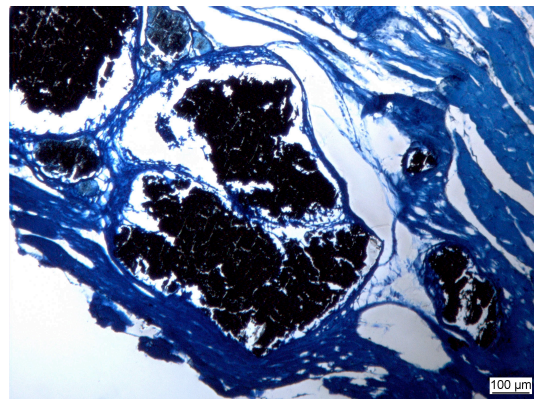


Abb. 16: betaGran® Dünnschnitt
von Kossa/McNeal i.m.

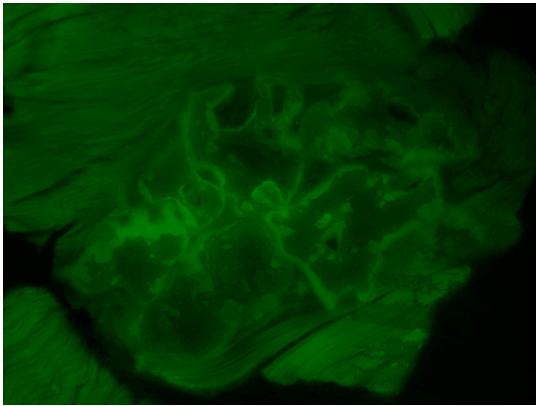


Abb. 17: NanoBone® Fluoreszenzschnitt,
Calcein grün i.m.

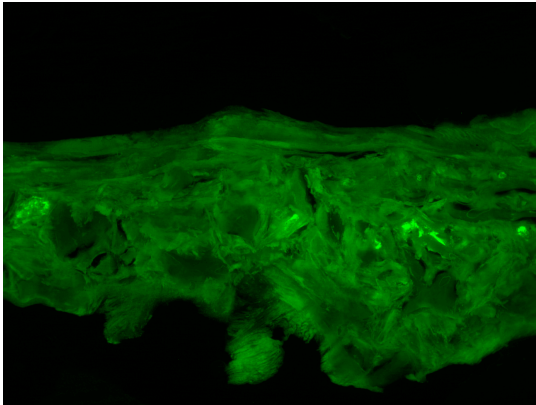


Abb. 18: Nexus IC® Fluoreszenzschnitt,
Calcein grün i.m.

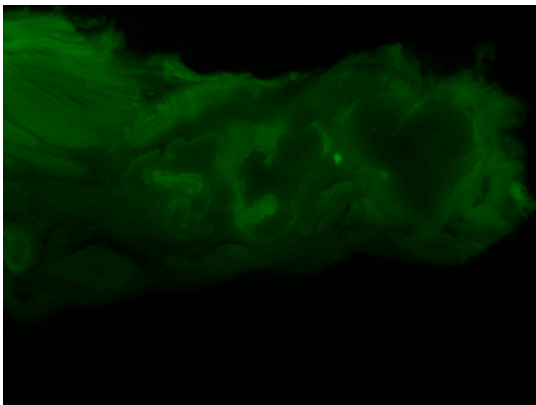


Abb. 19: betaGran® Fluoreszenzschnitt,
Calcein grün i.m.

Tabellen

Tabelle A.1: Ergebnisse der histologischen Auswertung mittels Scoresystem; Mittelwerte und ihre Standardabweichungen

Parameter	NanoBone		betaGran		Nexus IC	
	Mittelwert	Anzahl	Mittelwert	Anzahl	Mittelwert	Anzahl
Materialkolonisation	1,00 ± 0.0	8	0	1	1.00 ± 0.0	10
Infiltrationsmenge	1.12 ± 0.4	8	0	1	1.30 ± 0.5	10
Apposition	0.86 ± 0.4	7	0	1	1.64 ± 0.8	11
Kalzifikation	0.62 ± 0.5	8	1	1	1.00 ± 0.0	11
Osteoid	0.00 ± 0.0	7	0	1	1.00 ± 0.0	11
enchondrale Ossifikation	0.00 ± 0.0	8	0.00 ± 0.0	2	0.27 ± 0.5	11
Bindegewebskapsel	0.00 ± 0.0	12	1.00 ± 0.0	8	1.00 ± 0.0	11
Fremdkörperriesenzellen	1.83 ± 1.0	12	1.75 ± 0.7	8	1.27 ± 0.8	11
Lymphozyten	1.08 ± 1.2	12	0.62 ± 0.7	8	1.27 ± 1.1	11
Makrophagen	2.25 ± 0.7	12	2.00 ± 0.8	8	1.91 ± 0.8	11
Plasmazellen	0.58 ± 0.5	12	0.25 ± 0.5	8	0.55 ± 0.5	11

Tabelle A.2: Ergebnisse der histologischen Auswertung der Materialparameter mittels Scoresystem

Code Probe	Ratten-nummer	Position	Material-kolonisation	Kalzifikation	Osteoid	enchondrale Ossifikation	Kapsel
Ar	1	mi re sc	1	1	0	0	1
Ar	1	mi li im	-	-	-	-	1
Ar	2	hi li sc	1	0	0	0	1
Ar	2	hi re im	-	-	-	-	1
Ar	3	vo li sc	1	0	0	0	1
Ar	3	vo re im	1	1	0	0	1
Ar	5	vo li sc	1	1	0	0	1
Ar	5	mi re sc	1	1	0	0	1
Ar	5	hi li sc	1	1	0	0	1
Ar	5	vo re im	1	0		0	1
Ar	5	mi li im	-	-	-	-	1
Ar	5	hi re im	-	-	-	-	1
bG	1	vo li sc	-	-	-	-	1
bG	1	vo re im	0	-	0	0	1
bG	2	mi re sc	-	-	-	-	1
bG	2	mi li im	-	-	-	-	-
bG	3	hi li sc	-	-	-	-	-
bG	3	hi re im	-	-	-	0	1
bG	6	vo li sc	-	-	-	-	1
bG	6	mi re sc	-	-	-	-	-
bG	6	hi li sc	-	1	-	-	1
bG	6	vo re im	-	-	-	-	1
bG	6	mi li im	-	-	-	-	1
bG	6	hi re im	-	-	-	-	-
Ne	1	hi li sc	1	1	1	0	1
Ne	1	hi re im	1	1	1	0	1
Ne	2	vo li sc	1	1	1	0	1
Ne	2	vo re im	-	-	-	-	-
Ne	3	mi re sc	1	1	1	0	1
Ne	3	mi li im	1	1	1	1	1
Ne	4	vo li sc	1	1	1	0	1
Ne	4	mi re sc	1	1	1	1	1
Ne	4	hi li sc	1	1	1	0	1
Ne	4	vo re im	1	1	1	1	1
Ne	4	mi li im	1	1	1	0	1
Ne	4	hi re im	-	1	1	0	1

Tabelle A.3: Ergebnisse der histologischen Auswertung der Materialparameter mittels Scoresystem

Code Probe	Ratten-nummer	Position	Infiltrationsmenge	Apposition
Ar	1	mi re sc	2	1
Ar	1	mi li im	-	-
Ar	2	hi li sc	1	1
Ar	2	hi re im	-	-
Ar	3	vo li sc	1	0
Ar	3	vo re im	1	1
Ar	5	vo li sc	1	1
Ar	5	mi re sc	1	1
Ar	5	hi li sc	1	1
Ar	5	vo re im	1	-
Ar	5	mi li im	-	-
Ar	5	hi re im	-	-
bG	1	vo li sc	-	-
bG	1	vo re im	0	0
bG	2	mi re sc	-	-
bG	2	mi li im	-	-
bG	3	hi li sc	-	-
bG	3	hi re im	-	-
bG	6	vo li sc	-	-
bG	6	mi re sc	-	-
bG	6	hi li sc	-	-
bG	6	vo re im	-	-
bG	6	mi li im	-	-
bG	6	hi re im	-	-
Ne	1	hi li sc	1	2
Ne	1	hi re im	1	1
Ne	2	vo li sc	1	1
Ne	2	vo re im	-	-
Ne	3	mi re sc	1	1
Ne	3	mi li im	2	3
Ne	4	vo li sc	1	1
Ne	4	mi re sc	2	3
Ne	4	hi li sc	2	1
Ne	4	vo re im	1	2
Ne	4	mi li im	1	1
Ne	4	hi re im	-	2

Tabelle A.4: Ergebnisse der histologischen Auswertung des zellulären Bildes mittels Scoresystem

Code Probe	Ratten-nummer	Position	Fremdkörperriesenzellen	Lymphozyten	Makrophagen	Plasmazellen
Ar	1	mi re sc	1	3	2	0
Ar	1	mi li im	2	1	3	1
Ar	2	hi li sc	1	0	1	0
Ar	2	hi re im	1	3	3	1
Ar	3	vo li sc	3	3	3	0
Ar	3	vo re im	3	0	3	1
Ar	5	vo li sc	1	0	2	1
Ar	5	mi re sc	3	1	1	0
Ar	5	hi li sc	3	1	3	1
Ar	5	vo re im	2	0	2	1
Ar	5	mi li im	2	1	2	1
Ar	5	hi re im	0	0	2	0
bG	1	vo li sc	3	0	3	0
bG	1	vo re im	1	0	1	0
bG	2	mi re sc	2	1	2	0
bG	2	mi li im	-	-	-	-
bG	3	hi li sc	-	-	-	-
bG	3	hi re im	1	1	3	0
bG	6	vo li sc	2	1	2	1
bG	6	mi re sc	-	-	-	-
bG	6	hi li sc	2	2	2	1
bG	6	vo re im	1	0	1	0
bG	6	mi li im	2	0	2	0
bG	6	hi re im	-	-	-	-
Ne	1	hi li sc	2	1	2	1
Ne	1	hi re im	3	2	3	1
Ne	2	vo li sc	1	3	2	0
Ne	2	vo re im	-	-	-	-
Ne	3	mi re sc	1	1	2	1
Ne	3	mi li im	1	3	3	1
Ne	4	vo li sc	2	1	3	1
Ne	4	mi re sc	1	0	1	1
Ne	4	hi li sc	1	2	1	0
Ne	4	vo re im	1	0	1	0
Ne	4	mi li im	1	1	2	0
Ne	4	hi re im	0	0	1	0

Danksagung

Zu aller erst und ganz besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg für die Überlassung des Themas, das Teil haben lassen an ihrem fachlichen Wissen, ihren Gedanken und für ihre Menschlichkeit bedanken. Sie hat mir gezeigt, dass jeder, sei er auch noch so „klein“, es wert ist, angehört und ernst genommen zu werden.

Herrn Prof. Dr. J. Auer möchte ich danken für die Unterstützung der MSRU, ohne die vieles wahrscheinlich nicht möglich wäre.

Prof. Dr. Wendelin Stark danke ich für die Übernahme des Koreferates dieser Arbeit.

Den Projektpartnern der Firma Smith&Nephew Orthopaedics AG möchte ich meinen Dank aussprechen für die kooperative und geduldige Zusammenarbeit und dass das unvorhergesehene Zusammentreffen in diesem Projekt geklappt hat.

Ein grosses Dankeschön an Käthi für ihre Geduld, Ruhe und gute Beratung im Labor. Herzlichen Dank an Flora für die Betreuung der Ratten und die Unterstützung mit ihrem Wissen.

An Dr. Monika Hilbe, Kati Zlinski und Sabina Wunderlin ein Dankeschön für die Hilfe bei allen grossen und kleinen Fragen rund um die Histo beziehungsweise bei der Erstellung der histologischen Präparate.

Vielen Dank an das gesamte Team des Tierspitals und an Rösli und Gottfried Knüsel.

Danke an meine Kollegen und Mitstreiter Mausi, Birthe, Berni, Kiki, Oli, Freddy, Inga, Silvana, Anja, Martin, Doro, Stephi, Karina, Käthi, Marcella, Sven, Sabine und Katja für die spezielle Zeit in der MSRU.

Meinen Freunden, die mich bis hier begleitet und die mich, meine Launen und mein Chaos ertragen haben, möchte ich ein riesen Dank aussprechen.

Meinem Bruder Bennie und meinen Eltern ein besonders herzliches Dankeschön für ihre Geduld und Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg.

Lebenslauf

Name: Hannah Kristine Junge

Geburtsdatum: 04.10.1981

Geburtsort: Göttingen/Deutschland

Nationalität: deutsch

1989 – 1994: Schweizerhof- Grundschule, Berlin

1994 – 2001: Wilma-Rudolph-Oberschule, Berlin

2001 – 2007: Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin,
Erteilung der Approbation am 02.01.2007

2007 – 2009: Anfertigung der Dissertation in der Musculoskeletal Research
Unit, Pferdeklinik, Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich unter
der Leitung von Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg

2009-2010 Durchführung einer wissenschaftlichen Studie zum Vergleich
verschiedener Behandlungsmethoden von Achsenfehlstellungen
beim Fohlen im Gestüt Lewitz, PS Pferdehaltung GmbH,
Neustadt-Glewe, Deutschland unter der Leitung von Prof. Dr.
Jörg Auer

ab 2010 Internship, Departement für Pferde, Vetsuisse Fakultät,
Universität Zürich
